



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**EVOLUČNÍ INŽENÝRSTVÍ CYANOBAKTERIÍ V KONTEXTU
AKUMULACE PHA**

EVOLUTIONARY ENGINEERING OF CYANOBACTERIA WITH RESPECT TO PHA ACCUMULATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Vašířová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Ota Samek Dr.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1524/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kristýna Vašířová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Mgr. Ota Samek Dr.**

Název diplomové práce:

Evoluční inženýrství cyanobakterií v kontextu akumulace PHA

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Využití vybraných stresových faktorů k evolučnímu inženýrství cyanobakterií
3. Charakterizace získaných adaptovaných kmenů v kontextu metabolismu PHA

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristýna Vašířová
student(ka)

Mgr. Ota Samek Dr.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo podrobit vybrané cyanobakteriální kmeny adaptivní evoluci a následně prozkoumat vlastnosti vzniklých adaptovaných kmenů, obzvláště jejich změny týkající se akumulace polyhydroxyalkanoátů (PHA). Teoretická část práce blíže charakterizuje problematiku cyanobakterií, PHA a jejich vzájemné propojení v oblasti evolučního inženýrství. Pro evoluční experimenty byly použity cyanobakteriální kmeny *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192. Na vybrané zástupce byly vyvíjeny selekční tlaky působením peroxidu vodíku a mědi. Vzniklé kultury a jejich schopnost akumulace PHA byly následně posouzeny metodou plynové chromatografie. Oba tyto zvolené selekční tlaky se ukázaly jako nevhodné, jelikož po jejich aplikaci na kultury byla pozorována vysoká inhibice růstu neumožňující aplikace metod evolučního inženýrství. V druhé půlce experimentální části byly sledovány poskytnuté adaptované kmeny na 6% NaCl. Prokázalo se, že adaptace má na mikroorganismy pozitivní vliv, jelikož vykazovaly lepší růst biomasy, vyšší odolnost při odolávání stresovým podmínkám a bylo pozorováno nepatrné navýšení akumulace PHA.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to subject selected cyanobacterial strains to adaptive evolution and subsequently investigate the properties of the resulting adapted strains, especially their changes related to polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation. The theoretical part of the work describes in more detail the issue of cyanobacteria, PHA and their interconnection in the field of evolutionary engineering. Cyanobacterial strains *Synechocystis sp.* 6803 and *Synechocystis salina* CCALA 192 were used for evolutionary experiments. Selection pressures of hydrogen peroxide and copper were applied to selected representatives. The resulting cultures and their ability to accumulate PHA were subsequently assessed by gas chromatography. Both of these selection pressures proved to be unsuitable, as strong growth inhibition was observed after their application to cultures, which did not allow the application of evolutionary engineering methods. In the second half of the experimental part, the provided adapted strains to 6% NaCl were monitored. Adaptation has been shown to have a positive effect on microorganisms, as they have a higher biomass content, better stress resistance and a slight increase in PHA accumulation.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cyanobakterie, polyhydroxyalkanoáty (PHA), evoluční inženýrství, *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Synechocystis salina* CCALA 192, průtoková cytometrie, adaptace

KEY WORDS

Cyanobacteria, polyhydroxyalkanoates (PHA), evolutionary engineering, *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Synechocystis salina* CCALA 192, flow cytometry, adaptation

VAŠÍŘOVÁ, K. *Evoluční inženýrství cyanobakterií v kontextu akumulace PHA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021. 77 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Ota Samek Dr.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce Mgr. Otě Samkovi Dr., za umožnění pracovat na zajímavém tématu. Dále bych chtěla poděkovat svým konzultantům, doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD a Mgr. Zuzaně Šedrlové za odborné vedení, pomoc v laboratoři, vstřícnost a hlavně trpělivost. Mé poděkování také patří všem kolegům v laboratoři, kteří byli vždy ochotni poradit a pomoci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Cyanobakterie	8
2.1.1	Stavba	9
2.1.2	Metabolismus	11
2.1.3	Výskyt	14
2.1.4	<i>Synechocystis</i>	16
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	17
2.2.1	Struktura	17
2.2.2	Vlastnosti.....	18
2.2.3	Biosyntéza PHA u cyanobakterií	19
2.2.4	Biodegradace PHA	20
2.2.5	Produkce PHA u cyanobakterií	21
2.2.6	Aplikace PHA	22
2.3	Evoluční inženýrství	23
2.3.1	Historie evolučního inženýrství	24
2.3.2	Postupy evolučních experimentů	24
2.3.3	Adaptace cyanobakterií na stresové faktory.....	26
2.3.4	Aplikace evolučního inženýrství.....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	30
3.1.1	Použité bakterie	30
3.1.2	Použité chemikálie	30
3.1.3	Použité přístroje.....	30
3.2	Příprava médií.....	31
3.2.1	Příprava média M22O	31
3.2.2	Příprava média BG-11.....	32
3.2.3	Kultivace cyanobakterií.....	33
3.3	Experimenty evolučního inženýrství	33
3.3.1	Adaptace na H ₂ O ₂	33
3.3.2	Adaptace na Cu ²⁺	33
3.4	Vystavení cyanobakterií akutnímu stresu	34
3.4.1	Tepelný stres	34
3.4.2	Stres mrazem	34

3.4.3	Stres kationty Cu^{2+}	34
3.4.4	Osmotický stres chloridem sodným	34
3.4.5	Stres peroxidem vodíku.....	34
3.4.6	Stres ethanolem	34
3.5	Stanovení biomasy.....	35
3.5.1	Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy	35
3.5.2	Gravimetrické stanovení biomasy	35
3.6	Stanovení obsahu PHA v biomase.....	35
3.6.1	Příprava kalibračních roztoků pro plynovou chromatografii	35
3.6.2	Příprava vzorků pro plynovou chromatografii	36
3.7	Stanovení viability buněk metodou průtokové cytometrie.....	36
3.7.1	Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii	36
3.8	Stanovení cyanobakteriálních barviv.....	37
3.8.1	Stanovení cyanobakteriálních barviv metodou UV-VIS spektroskopie	37
3.8.2	Stanovení cyanobakteriálních barviv extrakcí	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Optimalizace média	38
4.2	Adaptivní laboratorní evoluce využívající peroxid vodíku	40
4.3	Adaptivní laboratorní evoluce využívající měď	43
4.4	Působení akutních stresů na kultury o rozdílném obsahu PHA.....	45
4.4.1	Akutní teplotní stres	45
4.4.2	Akutní stres Cu^{2+}	46
4.5	Charakterizace kmenů adaptovaných na 6% NaCl.....	50
4.5.1	Změny obsahu cyanobakteriálních barviv.....	50
4.5.2	Morfologie buněk.....	52
4.5.3	Obsah biomasy a PHA	53
4.5.4	Rezistence proti akutnímu stresu.....	55
5	ZÁVĚR.....	60
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	76

1 ÚVOD

Sinice, jiným názvem cyanobakterie, jsou mikroorganismy u většiny lidí zaškatulkované jako škůdci, kteří kontaminují koupaliště a nádrže s pitnou vodou. Málokdo však ví, že jakožto součást fytoplanktonu patří mezi největší producenty kyslíku na Zemi. Má se dokonce za to, že byly v historii hlavním prvkem v přeměně uhlíkové atmosféry na atmosféru bohatou na kyslík. Mimo fotosyntetické vlastnosti si získaly sinice v posledních letech pozornost díky jejich potenciálnímu využití v biotechnologickém průmyslu. Byla u nich zjištěna bohatá produkce bioaktivních sloučenin použitelných v medicíně a své využití najdou také při výrobě biopaliv, barviv, doplňků stravy, hnojiv aj. Několik kmenů sinic dokáže navíc akumulovat uhlík ve formě polyhydroxyalkanoátů s velice důležitým biotechnologickým využitím.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery hydroxyalkanových kyselin vlastnostmi podobné petrochemicky produkovanému polypropylenu a polyethyleny. Plasty jsou součástí života moderní civilizace, s postupem času však začíná být velkým problémem s jejich hromaděním na všech místech planety. Nevýhodou těchto petrochemicky vyráběných plastů je jejich dlouhá doba rozkladu, toxicita a výroba z neobnovitelných zdrojů. PHA produkované širokou škálou mikroorganismů, se schopností rozkladu během několika měsíců a netoxickým účinkem na životní prostředí, představují ekologickou variantu těchto plastů. Mikroorganismy PHA akumulují ve formě intracelulárních granulí a primárně slouží jako zásobárna uhlíku, která jim pomáhá přežít nepříznivé působení vnějších vlivů. Množství produkovaného PHA se uvnitř buněk přirozeně navyšuje při vystavení stresu, což je využíváno k cílenému zefektivnění produkce.

Působení vnějších stresů obecně posouvá veškeré živé organismy kupředu a jedná se o hlavní motor v procesu evoluce. Cyanobakterie patří mezi nejrozšířenější organismy na Zemi, žijící v široké škále stanovišť. Za svou variabilitu mohou vděčit procesu adaptace, kdy došlo k přizpůsobení vnějším tlakům, na základě čehož jsou schopny přežívat a prosperovat i v podmínkách pro jiné organismy neobyvatelných. Jednoduché organismy se obecně adaptují mnohem rychleji než organismy složitější, jako třeba savci. Jejich snadné a rychlé adaptace je často využíváno v procesech evolučního inženýrství, které přenáší vnější stresy do laboratorního měřítka a dávají tak vzniknout novým odolnějším jedincům s lepšími schopnosti produkce.

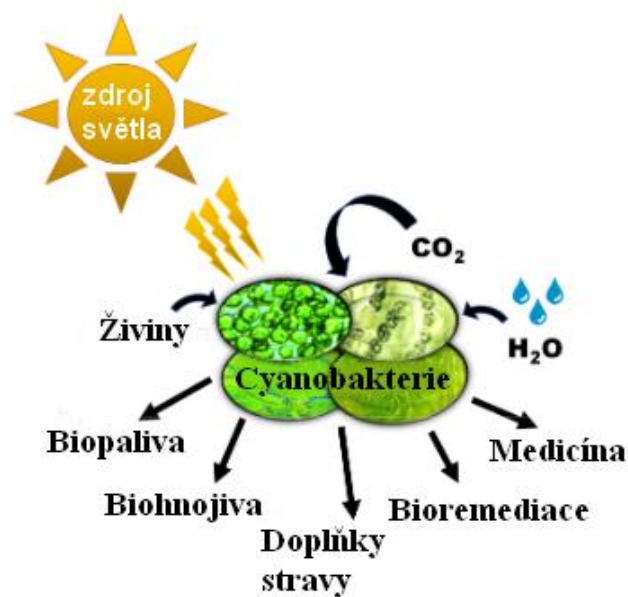
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cyanobakterie

Cyanobakterie, jiným názvem také sinice, modrozelené bakterie, či modrozelené řasy. Jedná se o velkou a široce rozšířenou skupinu fotoautotrofních mikroorganismů, které vznikly a diverzifikovaly se již v rané historii Země. Má se za to, že se cyanobakterie nachází na Zemi déle než 3,5 miliardy let, a že v důsledku jejich schopnosti fotosyntézy jsou zodpovědné za přechod atmosféry bohaté na uhlík do atmosféry bohaté na kyslík [1]. Jsou také považovány za původce rostlinného chloroplastu. Jedná se o organismy disponující buněčnými mechanismy, díky nimž jsou lehce přizpůsobitelné různým změnám prostředí a snadno tak rostou v široké škále stanovišť, včetně vodních, suchozemských a stanovištích s extrémními podmínkami, jako jsou chladná jezera Antarktidy, nebo horké prameny [2; 3].

Cyanobakterie jsou gramnegativní organismy s jednoduchou prokaryotickou buněčnou strukturou. Pohyb je vždy klouzavého typu, charakteristického pro pohyblivé zelené bakterie a mnoho skupin gramnegativních bakterií. Od svého uznání jako samostatné biologické skupiny na počátku 19. století byly cyanobakterie zařazeny do třídy řas se společným názvem *Cyanophyta*. Zařazení, které bylo založeno především na jejich fotosyntetických vlastnostech podobných s rostlinami, se stalo kolem roku 1960, kdy došlo k objasnění základních rozdílů mezi prokaryoty a eukaryoty neudržitelné. Sinice poté byly ze třídy řas vyřazeny. Tyto mikroorganismy existují ve formě jednotlivých buněk, kolonií, nebo vláken. V rámci vláken je patrná diverzita jednotlivých buněk. Ačkoliv jsou sinice v přírodě mikroskopické, mohou být viditelné pouhým okem, pokud se nacházejí ve formě kolonií v podobě květů [4]. Přestože cyanobakterie nesou název modrozelené, mohou mít díky kombinacím fotosyntetickým pigmentů, jako jsou chlorofyly, karotenoidy nebo fykobiliny, různá zbarvení [2].

Existuje celá řada jedinečných charakteristik sinic, které přiměly vědce uvažovat o jejich potenciálním přijetí v průmyslovém měřítku (viz Obr.1) po celém světě. Mimo schopnosti produkovat kyslík také rostou rychlejším tempem a mají větší potenciál výnosu ve srovnání s potravinářskými plodinami. S ostatními plodinami nesoutěží o zdroje potravin a surovin a lze je pěstovat na neúrodných a neproduktivních půdách. V blízké budoucnosti by byla v komerčním měřítku možná masová kultivace sinic, která by mohla být použita k výrobě biopaliv, antioxidantů, biologických hnojiv, léků, biologicky odbouratelných polymerů, doplňků stravy a barev [2]. V široké veřejnosti jsou však sinice stále známé hlavně produkcí široké škály bioaktivních sloučenin, a to především toxinů známých jako cyanotoxiny, mezi které patří např. mikrocystiny, anatoxiny nebo saxitoxiny. Díky tomuto pozoruhodnému atributu produkují sinice toxické květy, které vyvolávají potenciální obavy o lidské zdraví. Na rychlý růst cyanobakterií a jejich toxicitu je tedy při manipulaci v průmyslovém měřítku nutno myslet [5].



Obr. 1: Využití cyanobakterií v průmyslovém měřítku, převzato a upraveno [2]

2.1.1 Stavba

Sinice vykazují značnou morfologickou rozmanitost. Základní morfologie zahrnuje jednobuněčné, koloniální a mnohobuněčné vláknité formy, přičemž se dělí do pěti řádů: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* a *Stigonematales*. Jednobuněčné formy, například v řádu *Chroococcales*, mají vejčité, kulovité, nebo válcovité buňky [4]. Vyskytují se jednotlivě a vznikají poté, co se dceřiné buňky oddělují po reprodukci binárním dělením. Buňky se mohou agregovat v nepravidelných koloniích, kde jsou drženy pohromadě slizovou matricí. Pravidelným dělením buněčné řady mohou vznikat uspořádanější kolonie. U řádu *Pleurocapsales* se vyskytuje zvláštní způsob reprodukce, který může doplňovat binární dělení. Hlavním způsobem replikace je zde řada po sobě jdoucích binárních dělení, při kterých z jedné mateřské buňky vzniká mnoho drobných dceřiných buněk (baeocyty) [4; 6].

Mnohobuněčná struktura skládající se z řetězce buněk se nazývá trichom. Trichom může být rovný, nebo stočený. Velikost a tvar buněk vykazují mezi vláknitými sinicemi velkou variabilitu. Zástupci řádu *Oscillatoriales* jsou tvořené nespojitými a nerozvětvenými trichomy a jsou složeny z identických buněk. Řády *Nostocales* a *Stiginemates* jsou charakteristické trichomy s heterogenním buněčným složením. Vegetativní buňky mohou poté být diferencovány na heterocysty, se silnou stěnou a schopností vázat dusík, nebo akineta, což jsou velké silnostěnné buňky obsahující rezervní materiály, umožňující přežití za nepříznivých podmínek. Shrnutí morfologie jednotlivých řádů je znázorněno v Tab. 1 [6].

Tab. 1: Charakteristika cyanobakteriálních řádů [4]

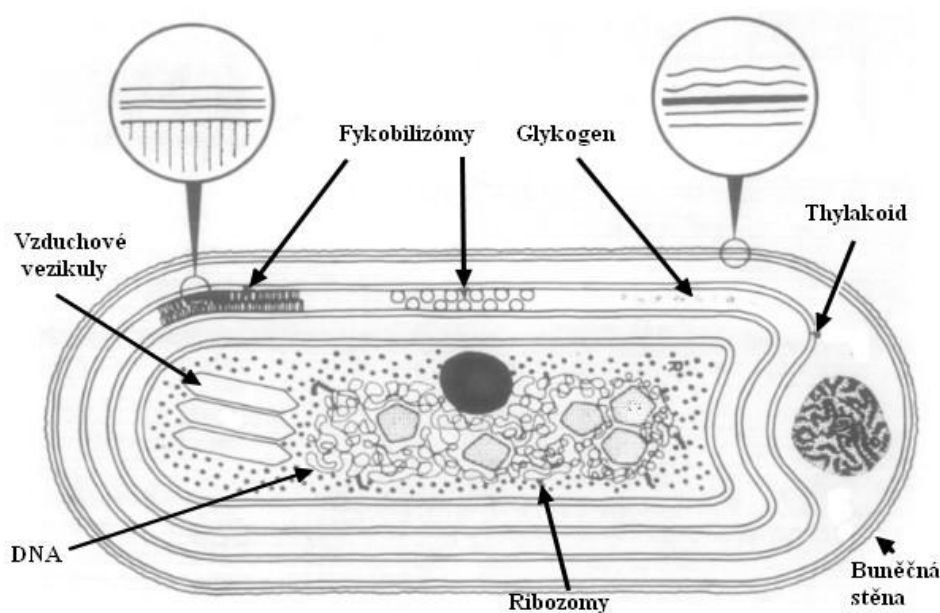
Řád	Morfologie	Rozmnožování
<i>Chroococcales</i>	Jednobuněčné, nebo kolonie	Binární dělení = rozdělení na dvě části
<i>Pleurocapsales</i>	Jednobuněčné, nebo kolonie	Baeocyty = rozdělení na mnoho menších částí
<i>Oscillatoriales</i>	Vláknité	Trichom = řetězec buněk
<i>Nostocales</i>	Vláknité heterocysty	Fragmentace trichomu = dělení řetězce buněk
<i>Stigonematales</i>	Rozvětvená vlákna	Fragmentace trichomu

Velikosti cyanobakteriální buňky je v rozmezí od 0,5 do 40 μm v průměru. Obvykle je pokryta hydrokopických slizovým obalem, který poskytuje ochranu před nepříznivými podmínkami a udržuje vlhkost, čímž chrání před vysycháním [3]. Sliz bývá často intenzivně zbarvený přítomností karotenoidu scytonemin, nebo barviva gleokapsin. Tloušťka, konzistence a vlastnosti obalu jsou ovlivněny podmínkami prostředí. Buněčný protoplast, je obklopen vícevrstvou buněčnou stěnou podobnou struktuře stěny gramnegativních bakterií [7]. Buněčná stěna se skládá z vnější zvlněné lipoproteinové membrány a peptidoglykanové vrstvy. Peptidoglykanová vrstva je obvykle o tloušťce 5–10 nm, u některých druhů rodu *Oscillatoria* však může být podstatně silnější až do 250 nm. Na buněčnou stěnu navazuje dvojvrstvá cytoplazmatická membrána. Tato selektivně propustná membrána slouží k aktivnímu transportu iontů, exkreci látek a udržuje fyziologickou integritu buňky [8].

Vnitřek buňky je vyplněn cytoplazmou, která se rozlišuje do dvou oblastí. Vnější oblast nazývaná chromoplazma a vnitřní bezbarvá oblast, nazývaná centroplazma [6]. Právě v chromoplazmě se nacházejí nejvýraznější cytoplazmatické prvky, kterými jsou thylakoidy. Jedná se o ploché váčky, jež jsou navzájem rovnoběžné a jsou od sebe vzdáleny 60–70 nm [8]. Každý thylakoid je tvořen dvěma těsně stlačenými membránami, které jsou základními strukturami pro výkon fotosyntézy. V membránách jsou umístěny komplexy chlorofylu α , α - i β -karoten, xanthofyly a nachází se zde také systém přenosu elektronů. Uspořádání thylakoidních membrán se u jednotlivých kmenů sinic liší. Nejjednodušší uspořádání se nachází u většiny kmenů *Synechococcus* [7]. Buňky obsahují 3–6 thylakoidních membrán, které jsou paralelně uspořádány k sobě navzájem a zároveň k vnějšímu povrchu buňky. U jiných jednobuněčných a vláknitých sinic, zejména u heterocyklických kmenů, jsou thylakoidy spletené a mohou zabírat velmi velkou část cytoplazmy [8].

Na povrchu thylakoidního váčku se nachází malé granule známé jako fykobilizómy, které mají přídavné fotosyntetické pigmenty známé jako fykobiliny. Fykobiliny jsou tří typů. Modře zbarvený fykocyanin a allofykocyanin a červeně zbarvený fykoerytrin. Různá tvorba fykobilinů vytváří specifické zbarvení, které je způsobeno absorpcí maximálního množství slunečního záření. Z tohoto důvodu není zbarvení cyanobakterií vždy zelené, ale může být také červené, fialové, či hnědé [8].

V cytoplasmě se dále nachází plynové vezikuly, jejich funkcí je udržovat vztlak, aby buňka mohla zůstat v určité hloubce vody a dostalo se k ní potřebné množství světla [3]. Kruhová DNA se nachází stočená ve vnitřní části cytoplazmy, známé jako centroplazma a není nijak oddělená od ostatních komponent. V cytoplasmě se také nachází zásobní látka, kterou je glykogen. Jako i jiní zástupci prokaryot cyanobakteriální buňka nemá jádro, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát, vakuoly, či lysozomy. Struktura buňky je zobrazena na Obr. 2 [3; 8].



Obr. 2: Struktura cyanobakteriální buňky, převzato, upraveno [8].

2.1.2 Metabolismus

Z metabolického hlediska jsou sinice univerzálními organismy. Všichni členové této skupiny jsou aerobní fotoautotrofové, kdy užívají kyslíkové fotosyntézy pro produkci uhlíku a energie, což vede k ovlivnění celé biosyntézy. Mají zásadní dopad na téměř všechny geochemické cykly, včetně globálního uhlíkového cyklu, globální recyklace kyslíku a fixace dusíku. Ve tmě vykazují sinice endogenní respirační metabolismus, který je za světla okamžitě inhibován. Některé druhy mohou být fakultativně chemoheterotrofní a mohou růst ve tmě na úkor cukrů. Růst za tmy je vždy mnohem pomalejší, než růst fotoautotrofní [9].

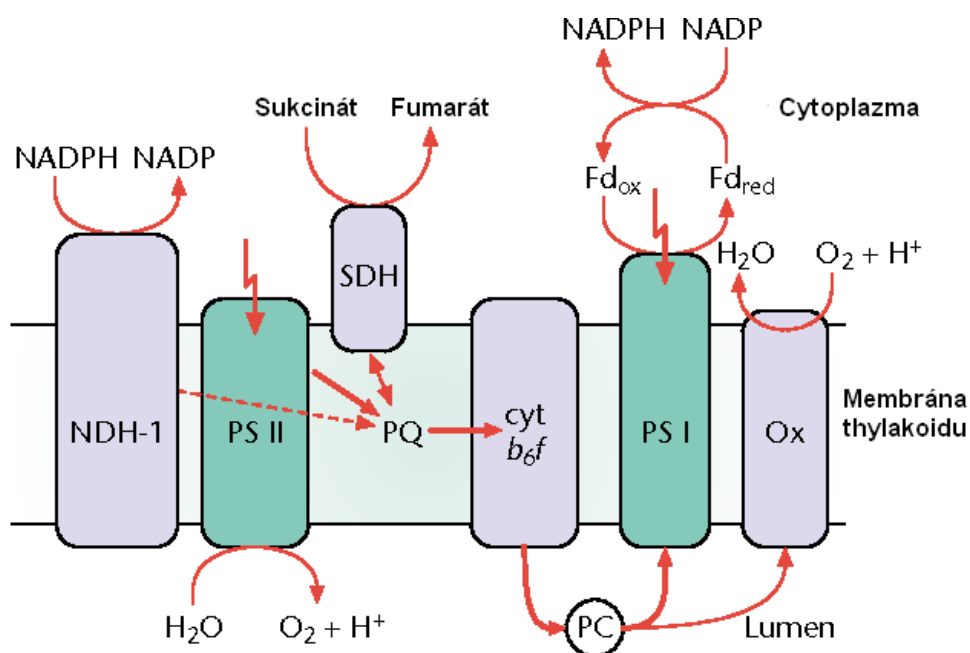
2.1.2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza a respirace vyžadují přenos elektronů, který je do značné míry katalyzován proteinovými komplexy v membránách. Kyslíková fotosyntéza, při které probíhá přeměna CO_2 a vody na cukry pomocí světelné energie, je opačným procesem k respiraci, kdy se cukry přeměňují na CO_2 a vodu za uvolnění energie [10]. Centrem fotosyntézy u sinic jsou thylakoidy, uvnitř kterých se nachází komplexy přenosu elektronů fotosystém I (PS I) a fotosystém II (PS II). Fotosystém II využívá sluneční energii ke štěpení vody a ke snížení plastochinonu (PQ). Elektrony jsou transportovány z PQ do cytochromu b_6f a odtud na rozpustný elektronový nosič nacházející se na lumenální straně thylakoidní membrány. Tímto rozpustným nosičem může být podle dostupnosti mědi plastocyanin, nebo cytochrom c_{553} . Kterýkoliv z rozpustných nosičů

slouží k redukci oxidovaného PS I centra, tvořeného chlorofylem [11]. Tato oxidovaná forma chlorofylu je tvořena světelně indukovaným přenosem elektronu z PS I na ferredoxin, nebo NADP. Redukovaný NADP může dále sloužit pro fixaci oxidu uhličitého. Fotosyntetický přenos elektronů vede ke vzniku protonového gradientu přes membránu thylakoidu, který slouží pro syntézu ATP pomocí ATP syntázy a může být dále využíván pro fixaci oxidu uhličitého a další buněčné procesy [10].

2.1.2.2 *Respirace*

Bez přístupu slunečního světla, kdy není možné získávat energii pomocí fotosyntézy, využívají sinice procesu respirace. V tomto procesu dochází k zisku energie z endogenních živin, nashromážděných během fotosyntézy. V době bez přístupu světla dochází k výraznému zpomalení růstu a buněčné údržby, aby se minimalizovala spotřeba ATP a glykogenu. Zatímco fotosyntéza probíhala pouze v thylakoidech, složky dýchacího řetězce jsou obsaženy jak v thylakoidech, tak v plazmatické membráně. Prolnutí obou těchto drah je znázorněno na Obr.3 [9]. Dýchací mechanismy v sinicích byly dlouho nejasné a nepochopené. V tomto důležitém aspektu cyanobakteriální fyziologie však bylo dosaženo značných poznatků, především použitím mutantů. Bylo zjištěno, že hlavní přenos elektronů do PQ v thylakoidech zajišťuje spíše aktivita sukcinátdehydrogenázy (SDH), než tok elektronů z NADPH. NADPH pravděpodobně přednostně slouží v procesu fixace uhlíku. Cyanobakterie jsou tedy schopny generovat sukcinát jako respirační meziprodukt a měly by tedy mít citrátový cyklus [11]. Podle starší literatury byl však citrátový cyklus považován za nefunkční [9].

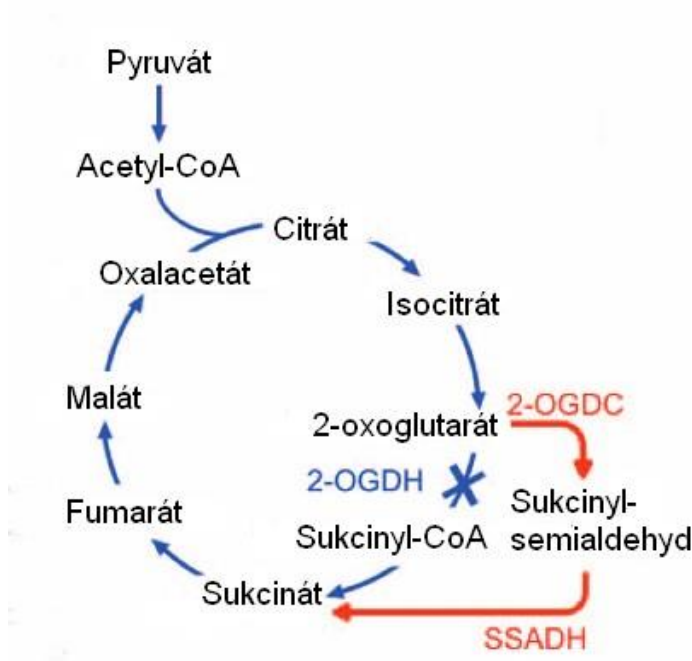


Obr. 3: Schematické znázornění transportních drah elektronů při fotosyntéze a respiraci, převzato, upraveno [11]

2.1.2.3 TCA cyklus

Cyklus trikarboxylových kyselin (TCA), známý také jako Krebsův cyklus, nebo cyklus kyseliny citronové. Jedná se o sled katabolických reakcí, podporujících syntézu GTP. Cyklus je zároveň začleněn v širší síti, která umožňuje přispívat k dalším aspektům metabolismu, včetně vazby na metabolismus dusíku [12]. V bakteriích má dráha dvě funkce. První z funkcí je oxidace dvou uhlíkových jednotek odvozených od acetyl-CoA, dále pokračujících na oxid uhlíčitý a NADH, který dodává elektrony pro oxidační fosforylaci. Druhou z funkcí je poskytování metabolických prekursorů potřebných pro biosyntézu buněčných složek [13].

Koncem šedesátých let, kdy studie přispěly ke znalostem metabolických drah a regulaci metabolismu, začalo být zřejmé, že sinice, podobně jako jiná prokaryota, mají TCA cyklus neúplný [12]. K tomuto závěru vedlo zjištění, že sinicím chybí enzym 2-oxoglutarátdehydrogenáza (2-OGDH), který katalyzuje přeměnu 2-oxoglutarátu (2-OG) na sukcinyl-CoA. Přerušení cyklu v bodě 2-OG zbavuje organismu nejen místa fosforylace na úrovni substrátu, ale také omezuje tvorbu NADH. Absence 2-OGDH byla také vnímána jako příčina, proč je většina sinic obligátními fotolithoautotrofy. Nedávné důkazy prokázaly u některých cyanobakterií přítomnost genů, kódujících dva enzymy, 2-oxoglutarátdekarboxylázu (2-OGDC) a sukcinát-semialdehyddehydrogenázu (SSADH). Tyto enzymy přeměňují 2-OG na sukcinát-semialdehyd a ten dále na sukcinát (Obr. 4). Ve srovnání se standardním cyklem, kde přeměna 2-oxoglutarátu na sukcinát vede k produkci jedné molekuly NADH a jednoho GTP, vede alternativní cesta 2-OGDC/SSADH k produkci jedné molekuly NADPH [13].



Obr. 4: TCA cyklus cyanobakterií, převzato, upraveno [12]

2.1.2.4 Metabolismus glykogenu

Sinice akumulují glykogen, jako hlavní intracelulární uložisko uhlíku a energie během fotosyntézy [14]. Biosyntéza glykogenu v sinicích začíná přeměnou glukózy-6-fosfát na ADP-

glukózu prostřednictvím postupného působení fosfoglukomutázy a ADP-glukózypyrofosforylázy. Glukózová část v ADP-glukóze se přenáší na neredukující konec α -1,4-glukanové kostry glykogenu pomocí jedné, nebo více glykogensyntáz. Větvící enzymy následně zavedou α -1,6-glykosidovou vazbu a řetězec se dále prodlužuje za vzniku glykogenové částice. Za tmy se glykogen štěpí glykogenfosforylázou, enzymy rozplétajícími větvení, α -glukanotransferázou a maltodextrinfosforylázou na fosforylovanou glukózu a volnou glukózu, které dále pokračují do katabolických drah. Jednou ze vstupní drah sacharidů je i metabolismus PHA [14; 15].

2.1.2.5 Sekundární metabolity

Cyanobakterie produkují sekundární metabolity v reakci na biotický a abiotický stres okolního prostředí. Poskytují ochranu, napomáhají při přežití a představují výhodu oproti ostatním druhům [16]. Mezi produkované látky patří široká škála toxinů a dalších bioaktivních sloučenin, které zahrnují 40 % lipopeptidů, 5,6 % aminokyselin, 4,2 % mastných kyselin, 4,8 % makrolidů a 9 % amidů [4]. Sekundární metabolity sinic vykazují vedle toxicity pro zvířata také antibakteriální, antikoagulační, antifungální, protizánětlivé, antimalarické, antiprotozoální, antituberkulotické, antivirové, protinádorové a cytotoxické aktivity [17].

Je známo, že některé rody sinic jako např. *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* nebo *Oscillatoria* produkují toxiny. Na základě toxikologických cílů je lze rozdělit do pěti skupin. První skupinou jsou hepatoxiny, které dostaly své jméno podle jejich negativního vlivu na hepatocyty jater. Dalšími skupinami jsou neurotoxiny, cytotoxiny, dermatotoxiny a dráždivé toxiny [18]. Mimo toxicity však upoutaly sekundární metabolity cyanobakterií pozornost vědců také z důvodu možného terapeutického využití. Jednou z látek s možným terapeutickým potenciálem je jedinečný protein Cianovirin-N. Jeho délka činí 101 aminokyselin a velikost 11 kDa. Jde o látku, která nevratně inaktivuje primární kmeny HIV a blokuje přenos infekce HIV mezi buňkami. Další z látek využitelných ve zdravotnictví je metabolit s názvem Borophycin, který vykazuje potenciální cytotoxicitu proti buněčným liniím lidských epidermoidů a lidských kolorektálních adenokarcinomů. Zároveň bylo zjištěno, že vykazuje antimikrobiální aktivitu [19]. Mezi ostatní sekundární metabolity s terapeutickým potenciálem dále patří Cryptohypocin, lipopeptidy a inhibitory proteáz [4].

2.1.3 Výskyt

Jak již bylo dříve zmíněno, sinice je možné nalézt na stanovištích sahajících od extrémně chladných arktických a antarktických zón, až po velmi horké prameny například v Yellowstonském národním parku [20]. Tato mimořádná abundance sinic je výsledkem jejich vysoké adaptability, vedoucí k toleranci na stanoviště s nízkým obsahem kyslíku, schopnosti využívat sulfanu jako fotoreduktantu místo vody a silné toleranci k působení ultrafialového záření. Další schopností sinic získanou v důsledku vysoké adaptability je vytváření symbiotických vztahů. Mezi prokaryoty jsou ve vytváření symbiotických vztahů, se širokou a velmi různorodou škálou hostitelů, jedinečné. Tato schopnost je částečně výsledkem vysoce účinného fotosyntetického aparátu, který je funkční i při velmi nízkých úrovních světla. Cyanobakterie slouží jako zdroj chloroplastů v symbiózách s řadou nefotosyntetických partnerů, jako jsou mořští bezobratlí, kdy svému hostitelskému partnerovi poskytují uhlík.

U fotosyntetických partnerů, jako jsou rozsivky, sinice naopak využívají své schopnosti fixovat dusík a zásobují svého hostitele dusíkem [21; 22].

2.1.3.1 Moře a oceány

Oceány a moře jsou největšími ekosystémy na planetě a sinice v nich obývají širokou škálu stanovišť. Vodní sinice se dělí do dvou velkých ekologických skupin. První ze skupin jsou planktonické sinice, volně se vznášející ve vodním sloupci [23]. Tyto sinice jsou přizpůsobeny vertikální migraci pomocí regulace vztlaku a produkují aerotopy, mikrokompartmenty obsahující plynové vezikuly. V mnoha oceánských oblastech jsou dominantním rodem sinice *Prochlorococcus*. Pravděpodobně se jedná o nejhojnější fotosyntetický organismus na planetě. Jeho stanovištěm jsou centrální části oceánu až do hloubky 150 m. Velikost populace je omezena zeměpisnými šířkami, jelikož nepřežijí teplotu nižší, než 15 °C. Planktonické sinice za příznivých podmínek rychle rostou a vytvářejí květy. Žijí především ve vysoce produktivních vodách bohatých na živiny. Mezi další zástupce této skupiny patří např. *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Trichodesmium*, či *Synechocystis* [24].

Druhou skupinou jsou sinice bentické, které se přichytávají na ponořené pevné povrchy. Jedná se o vláknité sinice s jedinečným klouzavým pohybem, které mohou tvořit tzv. rohože, což jsou hustá, vícevrstvá společenství mnoha druhů, která rostou na sedimentech [25]. Nejrozšířenějším zástupcem bentické skupiny je vláknitá sinice rodu *Lyngbya*, kvetoucí ve stanovištích tropických a subtropických korálových útesů a mořských řas [26]. Mezi další zástupce patří vláknité fotosyntetické sinice rodu *Moorea*, které tvoří rohože a květy v mělkých vodách, nebo sinice rodu *Coleofasciculus*, či *Hydrocoleum* [27].

2.1.3.2 Sladkovodní plochy

Stejně jako sinice mořské se sladkovodní sinice dělí na planktonické a bentické. Autotrofní pikoplanktony, skládající se převážně ze sinic o velikosti menší než 3 μm, představují primární producenty jak v oceánech, tak ve velkých sladkovodních jezerech. Ve velkých hlubokých jezerech převládají jednobuněčné pikocyanobakterie, zatímco mělčí, teplejší a na živiny bohatší jezera osídluje převážně jejich mikrokolonie [28]. U autotrofních planktonů dominují zástupci rodu *Synechococcus*, bohatí na fykoerytrin. Dalšími velmi důležitými zástupci jsou rody *Cyanobia* a *Synechocystis*. Do sladkovodních planktonů se řadí také největší producent toxinu microcystin, a to rod *Mikrocystis*, vyskytující se především v teplých jezerech [29].

Sladkovodní bentické sinice obývají, stejně jako ty mořské, sedimenty a tvoří na nich soudržné rohože. Na dně jezer a rybníků se vyvíjejí soudržné rohože, skládající se většinou z rodů *Oscillatoria*, *Aphanothece* a *Phormidium*. Tyto útvary se později od sedimentů oddělí a stávají se z nich rohože plovoucí, které lze pozorovat na hladině stojatých jezer [30].

2.1.3.3 Půda

Výskyt sinic a jejich rozmanitost v půdě je ovlivněn řadou faktorů okolního prostředí, jako je vlhkost, teplota, struktura půdy, koncentrace solí, výživa a biotické interakce. Největší výskyt sinic je v oblastech s vysokou vlhkostí, avšak existuje spousta druhů, které prospívají i v suchých nehostinných oblastech pouští, kde je život tlačěn za limity. V těchto oblastech se cyanobakterie nachází především v komunitách biologických krust. Krusty lze nalézt na všech

suchých místech světa, včetně oblastí polárních. Skládají se z vlhké povrchové půdy agregované řasami, sinicemi, houbami, lišejníky a mechy. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je rod *Chroococcidiopsis*, jehož přibližně 250 kmenů je zařazeno do Kulturní sbírky mikroorganismů z extrémního prostředí [31; 32].

2.1.4 *Synechocystis*

Pro tuto práci byly vybrány jako modelové mikroorganismy cyanobakterie z rodu *Synechocystis*, a to konkrétně kmeny *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192. *Synechocystis* je rod jednobuněčných sinic patřících do řádu *Chroococcales*. Morfologicky je tento rod jasně definován, jako kokoidní sférické buňky s perietálními thylakoidy, které žijí osamoceně na různých stanovištích a v následujících generacích se dělí ve dvou kolmých rovinách [33].

2.1.4.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Kmen *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Obr. 5) patří mezi mezofilní sinice nefixující dusík. Jedná se o první fototrofní organismus, jehož kompletní genom se podařilo sekvenovat a stala se modelovou cyanobakterií hojně využívanou vědci celého světa. Kmen byl izolován ze sladkovodního jezera a uložen do sbírky Pasteur Culture Collection (PCC) v roce 1968. Cyanobakterie je kulovitého tvaru bez plynových vezikul nebo pláště, reprodukuje se pomocí dělení a ideální teplota růstu se pohybuje mezi 32 a 38 °C [34]. Na počátku 80. let 20. století byl kmen uznán za spontánně transformovatelný, aby integroval cizí DNA do svého genomu a byl tak schopen přežít růst v široké škále podmínek. Vytvoření mutanti se mohou použít např. pro studium syntézy pigmentů a jejich regulace, syntézy tokoferolu, metabolismu uhlíku, dýchání, fotosyntézy a řadu dalších procesů [35].



Obr. 5: Mikroorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 [36]

2.1.4.2 *Synechocystis salina* CCALA 192

Dalším kmenem s velkým biotechnologickým potenciálem je mořská cyanobakterie *Synechocystis salina* CCALA 192, uložena ve sbírce Culture Collection of Autotrophic

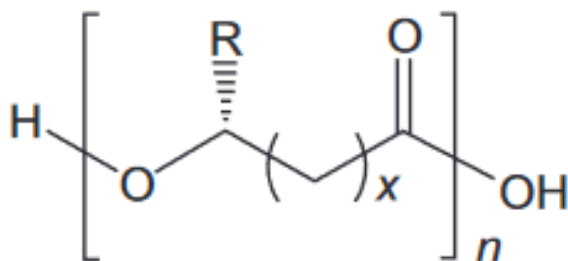
Organismus (CCALA). Mořské cyanobakterie jsou vhodné pro biotechnologické využití pro svou vysokou odolnost vůči výkyvům slanosti a lze je pěstovat i ve sladké vodě. Zároveň je v mořských pobřežích pozorována vysoká produktivita i navzdory změnám v přísunu živin a parametrech vody. Veškeré tyto vlastnosti naznačují užitečnost pro výrobu biomasy z odpadních vod. Kromě toho existuje několik zmínek o použití smíšených kultur kmene *Synechocystis salina* pro zachycení CO₂, čištění odpadních vod, výrobu biopaliv a syntézu bioaktivních sloučenin [37].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální biopolymery s širokou škálou funkcí a aplikací. Jedná se o polyestery hydroxykyselin, které jsou ve formě intracelulárních granulí uloženy v buněčné cytoplazmě, kdy jednotlivé granule mají velikost od 0,2 do 0,5 μm [38]. Poprvé byly objeveny v roce 1926 u bakterie *Bacillus megaterium* ve formě poly(3-hydroxybutyrátu) francouzským vědcem Mauricem Lemoignem [39]. Bakterie akumulují PHA jako zásobní formu energie a uhlíku a v jeho přítomnosti zároveň vykazují větší rezistenci vůči vnějším vlivům, jako je působení UV záření, nepříznivá teplota, vysoké pH aj. K akumulaci většinou dochází, když je zdroj uhlíku poskytnut v nadbytku a omezují se další živné prvky, jako je fosfor, dusík aj. Obsah PHA v bakteriálních buňkách může dosahovat až 90 % jejich suché hmoty. Jakmile se PHA z bakteriální buňky extrahuje, vykazují vlastnosti podobné polypropylenu [38].

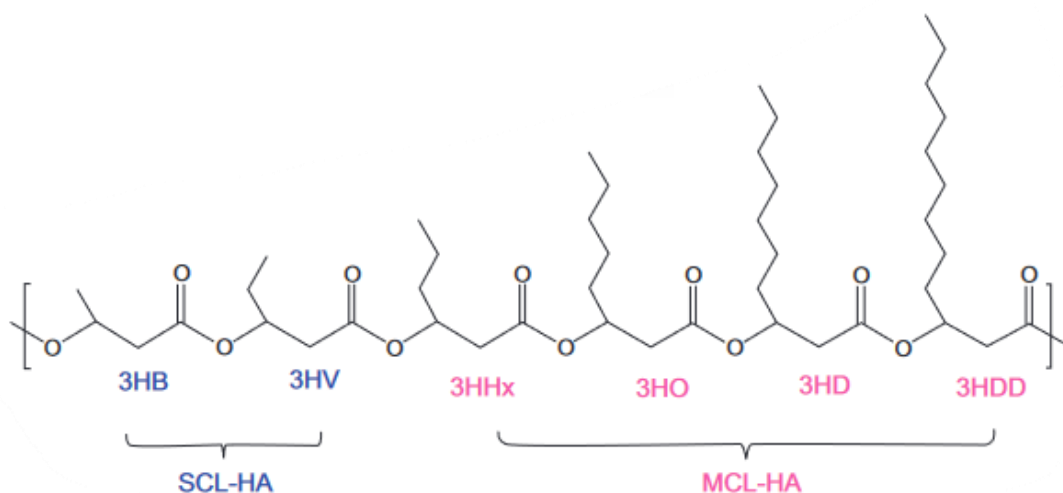
2.2.1 Struktura

Polyhydroxyalkanoáty jsou primárně lineární polyestery, tvořené 600 až 35 000 monomerními podjednotkami 3-hydroxy-substituovaných kyselin. V důsledku stereospecifity polymeračních enzymů, se až na několik málo výjimek nachází hydroxykyseliny v *R*-konfiguraci [40]. Jednotlivé monomery jsou v polymer spojeny esterovými vazbami, nacházejícími se mezi karboxylovou skupinou jednoho monomeru a hydroxylovou skupinou monomeru sousedního. Poloha hydroxylové skupiny je poněkud proměnlivá, v drtivé většině se nachází ve formě 3-hydroxykyselin, již však byly začleněny také 4-, 5-, a 6-hydroxykyseliny [41]. Každá monomerní jednotka obsahuje *R* skupinu postranního řetězce, kterou je obvykle nasycená alkylová skupina, nebo také méně často se vyskytující nenasycená alkylová skupina, rozvětvená alkylová skupina a substituovaná alkylová skupina [42]. Obecný vzorec polyhydroxyalkanoátů je možné vidět na Obr. 6.



Obr. 6: Obecný vzorec polyhydroxyalkanoátů [43]

PHA lze klasifikovat v závislosti na počtu atomů uhlíků v monomeru. Krátký řetězec obsahující 3–5 atomů uhlíku se označuje jako SCL-PHA (*short chain lenght*), středně dlouhý řetězec obsahující 6–14 atomů uhlíku se označuje jako MCL-PHA (*medium chain lenght*) a řetězec obsahující 15 a více atomů uhlíku nese označení LCL-PHA (*long chain lenght*) [40]. Například poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), poly(3-hydroxyvalerát) (PHV) a jejich kopolymery poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV) jsou typickými příklady polyhydroxyalkanoátů s krátkým řetězcem, zatímco poly(3-hydroxyoktanoát) (PHO) a poly(3-hydroxynonanoát) (PHN), které jsou primárně vytvořeny jako kopolymery s 3-hydroxyhexanoátem (HHx), 3-hydroxyheptanoátem (HH) a 3-hydroxydekanoátem (HD), jsou typickými příklady MCL-PHA (Obr. 7). Různých monomerů bylo identifikováno více než 150 druhů, což činí z PHA největší skupinu přírodních polymerů a toto číslo se neustále zvyšuje zaváděním nových typů chemickou nebo fyzickou modifikací [43].



Obr. 7: Rozdíl mezi strukturami SCL-PHA a MCL-PHA [43]

2.2.2 Vlastnosti

Vlastnosti PHA závisí především na délce řetězce a na molekulové hmotnosti. Výběrem správného producenta je možné vlastnosti polymeru do značné míry přizpůsobit požadavkům pro budoucí aplikaci [44].

Molekulová hmotnost polymeru se v závislosti na typu producenta pohybuje v rozmezí 50 000–1 000 000 Da. Jedná se o opticky aktivní polyester, který je nerozpustný ve vodě a stabilní při vystavení UV záření [45]. V buňce se PHA vyskytují v amorfním „tekutém“ stavu a po extrakci pomocí organických látek se stávají vysoce krystalické. Po krystalizaci dochází ke ztrátě pevnosti a polymer se stává tuhým, avšak velmi křehkým. Z toho důvodu je v dnešní době množství studií na extrakci polymeru v amorfním stavu, což by vedlo k zachování původní pevnosti [46].

Nejvíce prozkoumaným je bezpochyby zástupce kategorie SCL-PHA poly(3-hydroxybutyrát) (PHB). Jedná se o nejběžnější typ PHA a schopnost bakterií produkovat a hromadit tento polyester se často používá, jako taxonomická charakteristika. PHB má vysoký stupeň

krystalinity (70 %) a tvoří tenké krystaly s bodem tání přibližně při 175 °C a bodem skelného přechodu při 4 °C. Bod teplotního rozkladu je při 200 °C a po jeho překonání již není možné dalšího zpracování. Blízkost teplot tání a tepelného rozkladu představuje značnou překážku při dalším zpracování. Co se týká Youngova modulu pružnosti, je PHB podobný polypropylenu (PP) [47]. Lepších vlastností je možné dosáhnout zavedením 3-hydroxyvalerátu do původní struktury PHB, čímž vznikne kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (PHBV). Tento kopolymer má nižší krystalinitu (60 %), což mu dodává menší tuhost a větší elasticnost. Teplota tání je u PHBV přibližně 130 °C a teplota skelného přechodu -13 °C [48]. Srovnání vlastností PHB, PHBV a PP je znázorněno v Tab. 2.

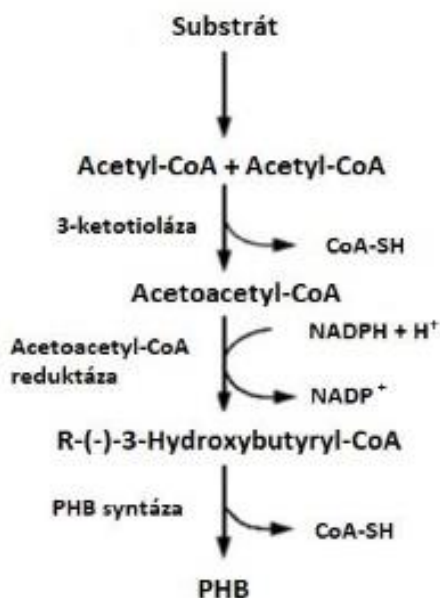
Tab. 2: Srovnání vlastností PHB, PHBV a PP [40; 49]

Mechanické vlastnosti	PHB	PHBV	PP
Bod tání [°C]	179	145	170
Pevnost v tahu [MPa]	40	32	34,5
Youngův modul pružnosti [GPa]	3,5	1,2	1,7
Tažnost [%]	6	50	100–600
Hustota [kg·dm ⁻³]	1,2	1,15	0,9
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-13	-10

2.2.3 Biosyntéza PHA u cyanobakterií

Jestliže se mikroorganismus nachází ve stresových podmínkách, kdy je mu poskytnut nadbytek uhlíkového zdroje a zároveň dochází k limitaci biogenních prvků, jako je fosfor, dusík, hořčík nebo síra, začne ve své cytoplazmě syntetizovat zásobní uhlíkový zdroj ve formě PHA, jehož polyesterové jádro je obklopeno proteiny. Biosyntetická dráha PHA je propojena s ostatními centrálními drahami mikroorganismu, včetně glykolýzy, Krebsova cyklu, β -oxidace, syntézy mastných kyselin aj [50].

Biosyntetická dráha PHA s krátkým řetězcem probíhá ve třech krocích. Vychází z prekurzorů, kterými mohou být acetyl-CoA, hydroxybutyryl-CoA a hydroxy-valeryl-CoA. Samotná dráha není příliš rozdílná u heterotrofních a fotoautotrofních prokaryot. První krok spočívá v Claisenově kondenzační reakci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Tento krok je katalyzován enzymem β -kethothiolázou (acetoacetyl-CoA thiolázou). Acetoacetyl-CoA se dále redukuje acetoacetyl-CoA reduktázou (dehydrogenázou) za přítomnosti NADPH, která katalyzuje hydrogenaci karboxylové skupiny na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Poté následuje polymerace monomeru a uvolnění koenzymu A za přítomnosti enzymu PHB syntázy, a tím vzniká PHB [51; 52; 53]. Biosyntetická dráha je zobrazena na Obr. 8.



Obr. 8: Biosyntetická dráha PHB u cyanobakterií, převzato, upraveno [53]

Výše zmíněné enzymy jsou kódovány čtyřmi geny, nacházejícími se na svou odlišných místech v genomu, které jsou regulované dvěma odlišnými operony. Gen *phaA2* kóduje enzym β -kethothiolázu v prvním kroku biosyntézy. Druhý krok, a tedy druhý enzym, kterým je acetoacetyl-CoA dehydrogenáza kóduje gen *phaB2*. PHB syntázu v posledním kroku kóduje *phaC* gen. [51].

2.2.4 Biodegradace PHA

Jednou z nejdůležitějších vlastností pro biotechnologický průmysl odlišující PHA od petrochemicky produkovaných plastů je jejich biodegradace, aneb rozklad materiálu bakteriemi, houbami, nebo jinými mikroorganismy. PHA se degraduje hlavně za aerobních podmínek, a to tehdy, jsou-li živiny, teplota, vlhkost a pH vhodné pro růst mikroorganismů. Díky tomu dochází k rozkladu nejlépe v půdě, nebo v kompostu, kde se doba degradace pohybuje v řádech měsíců. V mořském prostředí se doba degradace pohybuje v řádech několika let. Ideální růstové podmínky se naproti tomu nevyskytují v laboratořích, díky čemuž biodegradabilita neobtěžuje každodenní aplikaci. Mimo podmínky prostředí jsou důležité i vlastnosti samotného polymeru. Velmi důležitým parametrem je složení PHA, kdy se složitostí a komplexností polymeru klesá účinnost degradace. Vliv na rozklad má také krystalinita, u které platí, že čím vyšší stupeň krystalinity, tím horší degradace. Rychlost degradace dále klesá v závislosti na molekulové hmotnosti, zde platí pravidlo, čím menší molekulová hmotnost, tím rychlejší degradace. Jestliže dochází k rozkladu polymeru za aerobních podmínek, degradačními produkty PHA jsou oxid uhličitý a voda, naproti tomu za anaerobních podmínek vzniká methan [40; 54; 55].

Mikroorganismy degradují PHA působením intracelulárních a extracelulárních depolymeráz. Esterová vazba ve vodě nerozpustného polymeru je pomocí těchto enzymů hydrolyzována a vznikají ve vodě rozpustné oligomery a monomery, využívané mikroorganismy jako zdroje živin [55]. Jednotlivé depolymerázy se od sebe liší jak molekulovou strukturou, tak především

substrátovou specifitou. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.2.2, PHA se uvnitř buňky nachází v amorfním stavu a po extrakci mimo buňku dochází k okamžité krystalizaci. Substrátová specifita depolymerizačních enzymů funguje právě na schopnosti rozpoznat tyto dva stavy [56].

Intracelulární degradace PHA v nativním amorfním stavu probíhá za přítomnosti intracelulární PHA depolymerázy (phaZ) a společně s ní se v závislosti na množství uhlíku a dusíku odehrává PHA syntéza. PhaZ mikroorganismu zajišťuje stálou dostupnost monomerních a oligomerních jednotek PHA [57]. Polymer je pomocí enzymu rozkládán ve sledu několika reakcí, až na acetyl-CoA, který dále pokračuje do citrátového a glyoxylátového cyklu [58]. Po uvolnění PHA do prostředí a jeho denaturaci na krystalickou formu, nejsou intracelulární depolymerázy schopny polymer dále hydrolyzovat a jsou v tomto případě nahrazeny depolymerázami extracelulárními. Jedná se o enzymy s nízkou molekulovou hmotností (<70 kDa) a vysokou stabilitou v širokém rozpětí teploty, iontové síly a pH, přestože jejich pH optimum se nachází v rozmezí 7,5–9,8 [55]. Společnou vlastností intracelulární a extracelulární depolymerázy je jejich schopnost hydrolyzovat esterové vazby nacházející se pouze v (R)-konfiguraci [59].

2.2.5 Produkce PHA u cyanobakterií

V biotechnologickém průmyslu dnešní doby probíhá produkce PHA ve velkých fermentorech pomocí heterotrofních bakterií, jako je *Cupriavidus necator* nebo rekombinantní *Escherichia coli*, které jsou schopny produkovat až 80 % PHA v suché biomase. Pro tyto fermentační procesy je zapotřebí velké množství zdrojů organického uhlíku, jakým je například glukóza, což představuje přibližně 50 % celkových výrobních nákladů [60]. Sinice jsou možnou alternativou pro produkci PHA, jelikož se jedná o globální primární producenty biomasy a pro vázání atmosférického CO₂ jim jako zdroj energie stačí pouze sluneční světlo [61].

Přirozený výskyt PHA u sinic je známý přinejmenším od roku 1966, nikdy však nebyly uvažovány jako potenciální producenti, jelikož obsah polymeru v suché biomase byl velmi nízký, a to méně než 6 % [52; 62]. Jedinou výjimku představuje termofilní zástupce *Synechococcus* sp. MA 19, ve kterém byl zaznamenán obsah PHA až 27 %. Jak již bylo výše popsáno, akumulaci PHA v bakteriích je možné podpořit přidavkem uhlíkového zdroje v nadbytku, nebo omezením dusíku, fosforu, či kyslíku. Doposud nejvyšší produkce PHB u cyanobakterií za autotrofních podmínek byla zaznamenána ve studii *Nishioka a kol. (2001)* u dříve zmíněného termofilního kmene *Synechococcus* sp. MA 19, kdy probíhala kultivace za limitace fosforu a konečný obsah PHB v suché biomase činil 55 % [63]. Produkce PHB byla zkoumána také u modelového kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803. Jeden z prvních záznamů a produkci PHB pomocí tohoto kmene byl v práci *Wu a kol. (2001)*, kdy při kultivaci za omezeného zdroje dusíku činil obsah polymeru v suché biomase 4,1 %, a naproti tomu u cyanobakterií kultivovaných za ideálních podmínek byl obsah polymeru pod detekčními limity [64]. Stejný kmen byl zkoumán o několik let později v práci *Panda a kol. (2007)*. Tentokrát již kultura kultivovaná za ideálních podmínek obsahovala 4,8 % PHB. Buňky kultivované při limitaci dusíku produkovaly 9,5 % polymeru a při limitaci fosforu obsahovaly dokonce až 11,2 % PHB v suché biomase. Při dodání acetátu a fruktózy, jako dalších zdrojů uhlíku se produkce navýšila až na 38 % polymeru [62]. Schopnost produkce PHA byla zkoumána také u druhého modelového kmene této práce *Synechocystis salina* CCALA 192.

U zmíněného zástupce byl při růstu za ideálních podmínek zaznamenán obsah PHB v suché biomase v rozmezí 5,5-6,6 %. Produkci je možné navýšit obohacením média o NaCl, nebo přidáním dalšího uhlíkového zdroje (např. acetát) [65].

Další možností, jak zvýšit množství produkovaného PHB je použití rekombinantních producentů. Jedná se o geneticky upravené kmeny, u nichž proběhla buď amplifikace genu, nebo potlačení biochemických drah soutěžících o acetát. Na konci 90. let, byl úspěch genetické modifikace experimentálně potvrzen [52]. *Sudesh a kol. (2002)* provedli genetickou modifikaci zástupce *Synechocystis* sp. PCC 6803, kdy byl do buňky vložen vektor z *Cupriavidus necator* nesoucí PHA syntázu. Kultivace probíhala za limitace dusíkem a konečná produkce PHB činila 11 % polymeru v suché biomase [66]. O několik let později *Khetkorn a kol. (2016)* zkoumali stejný kmen, ale tentokrát jeho modifikace proběhla zvýšením exprese nativních genů PHA. Při fotoautotrofním růstu za limitace dusíkem tento rekombinant obsahoval 26 % PHB v suché biomase, což je oproti původním 9,5 % výrazné zlepšení. Po přidání acetátu, jako zdroje uhlíku se produkce navýšila dokonce až na 35 % PHB v suché biomase [67; 68].

2.2.6 Aplikace PHA

Polyhydroxyalkanoáty, jakožto jediná rodina polyesterů zcela syntetizovaná biologickými prostředky, vykazují značný potenciál pro budoucí aplikace jako obalové materiály, biopaliva, nanovlákná, nebo v biomedicínském odvětví. Hlavním důvodem k jejich využití jsou podobné vlastnosti polymerů na bázi ropy, zároveň však vynikají biologickou kompatibilitou a dlouhou dobou vstřebávání. Velkou průmyslovou výrobu lze navíc provádět ekologicky a bez složitého vybavení [69].

2.2.6.1 Obalové materiály

Obalové materiály na bázi ropy jsou velkým ekologickým problémem dnešní doby. PHA mohou jako biodegradovatelná alternativa tyto materiály nahradit a pomoci tak ke snížení znečištění životního prostředí. Biologicky odbouratelné obalové materiály mohou být pomocí mikroorganismů rozloženy na oxid uhličitý a vodu. PHA lze díky jeho vlastnostem, metodami vstřikováním, lisování a vyfukování zpracovat na láhve, pytle a jiné filmy [70]. Při testování filmu z kopolymeru PHBV byla zjištěna jeho stabilita ve všech simulacích potravin (voda, 3% kyselina octová, 20% ethanol, isooktan, olivový olej) a po přidání 1% ligninu k samotnému čistému kopolymeru klesá o 77 % propustnost pro kyslík a o 91 % pro oxid uhličitý. Film je rovněž možné potáhnout roztokem oxidu zinečnatého, čímž získá antibakteriální vlastnosti vhodné pro využití v obalových materiálech potravin [71; 72].

2.2.6.2 Zdravotnictví

Biodegradabilita a biokompatibilita dělá z PHA vhodného adepta pro adhezi a proliferaci buněk v oblastech tkáňového inženýrství a biomedicíny [73]. V oboru tkáňového inženýrství mohou být PHB a kopolymer PHBV použity jako matrice pro *in vitro* proliferaci různých lidských buněk, jako jsou buňky endotelu, izolované hepatocyty a fibroblasty. Přidáním hydroxyapatitu (HA) k polymeru PHB vznikne tvrdý kompozit použitelný v tkáňovém inženýrství kostí. Tento kompozit nevykazuje žádné zánětlivé reakce ani po jednom roce expozice a výrazně podporuje tvorbu kostí [74]. V tkáňovém inženýrství kostí je možné využít také kombinace scaffoldu

poly(mléčné-co-glykolové kyseliny) (PLGA) a mikrosfér PHBV, čímž vzniká materiál s pórovitostí více než 80 % [75]. Biodegradovatelné scaffoldy tvořené polymerem PHB mají své využití i u měkkých tkání, a to v tkáňovém inženýrství srdečních chlopní k nápravě defektů a mikrosféry PHBV, podporující primární neurony našly využití, jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství neuronů [76].

Díky výše zmíněným vlastnostem je o polyhydroxyalkanoáty zájem i v oblasti nosičů léčiv. Mikro a nanosféry PHA můžou představovat vrchní obal léčiv, dovnitř kterého jsou zakomponovány a později po degradaci uvolněny léčivé látky [77]. V 60. letech byl polymer PHB použit v chirurgii k nápravě poškozeného močového [78]. Dále mohou být PHA použity k opravě nervů, jako alternativa ke konvenčnímu nervovému štěpu, jako kryty ran, nebo ortopedické implantáty [79].

Jednou z nejrozšířenějších oblastí vědy, která má široké spektrum využití jsou nanotechnologie. V lékařství otevřely nové obzory především kontrolou hmoty v malém měřítku [80]. Jednou z aplikací PHA v tomto odvětví je selektivní imobilizace bílkovin na proteinových čipech, sloužících k specifické detekci viru hepatitidy B. Dále se využívají k tvorbě tenkých filmů a nanogelů [81]. Koloidní polymerní nanočástice mohou najít využití, jako oční kapky. PHB slouží také pro přípravu nanokapsulí a mikrokapsulí, vhodných pro cílenou aplikaci léčiv, například při nádorovém onemocnění jater [82].

2.3 Evoluční inženýrství

Evoluční inženýrství, jiným názvem adaptivní laboratorní evoluce (ALE), nebo buněčná řízená evoluce je, častou používanou metodou v biologických studiích pro náhled do základních mechanismů molekulární evoluce a adaptivních změn, projevujících se v mikrobiálních populacích během dlouhodobé selekce za předem stanovených podmínek [83]. Biologická katalýza zároveň nabízí několik výhod oproti chemické syntéze, jako je například stereoselektivní produkce chemických sloučenin [84]. Experimenty v rámci adaptivní laboratorní evoluce jsou stále populárnější technikou jak pro vylepšení mikrobiálních fenotypů, tak pro zkoumání biologických jevů. Dané postupy se osvědčily, jako vysoce účinné při optimalizaci produkčních kmenů. ALE se tak stalo široce využívaným nástrojem pro biotechnologické aplikace, vedoucím ke zlepšení výnosů a snížení nákladů v průmyslové výrobě [83]. V dnešní době patří mezi nejběžnější biotechnologické aplikace této metody aktivace latentních drah k použití nepůvodních substrátů, nebo k vytvoření nepůvodních produktů, dále rozšíření možností použitelných substrátů, jako jsou cukry, a především přizpůsobení bakteriálních kmenů různým podmínkám prostředí, jako je odolnost vůči stresu běžně se vyskytujícímu v prostorech průmyslové výroby [85]. Oproti genovému inženýrství, založenému na amplifikaci cizího genu do mikroorganismu není u ALE zapotřebí znalost genomu a nedochází k nepředvídatelným nežádoucím reakcím souvisejícím právě s amplifikací cizího genu [86].

Jednou z nejzajímavějších vlastností mikroorganismů je jejich schopnost rychle se adaptovat na rozmanité podmínky prostředí [87]. Nejjednodušší forma adaptivní laboratorní evoluce spočívá v prodloužené kultivaci buněk ve zvoleném prostředí tak, aby postupně docházelo

k selekci jedinců s vytvořenou prospěšnou mutací. Vzhledem k rychlosti, jakou můžou vzniknout příznivé mutace lze s jistotou říci, že mnoho biologů adaptivně vyvinulo laboratorního mikroba jednoduše prostřednictvím nevyhnutelných cyklů růstu, chlazení aj. podílejících se na běžné kultivaci buněk [88]. Spolehlivost evoluce u přírodního výběru odolných mutantů umožňuje provádět optimalizaci kmene, aniž by byla nutná znalost genetických změn k uskutečnění těchto mutací [89]. Během mikrobiální ALE se mikroorganismus pěstuje po delší dobu za jasně definovaných podmínek, a to v řádu týdnů až let, což umožňuje selekci vylepšených fenotypů. Mikrobiální buňky jsou vhodnými adepty pro studie díky jejich nízkým požadavkům na živiny, lze je snadno kultivovat v laboratorii, obecně rostou velmi rychle a lze je kultivovat několik generací během dnů až měsíců [83].

2.3.1 Historie evolučního inženýrství

Principy, na nichž jsou založeny experimenty evolučního inženýrství sahají do historie až k vědcům, jako byli Antoine van Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch a hlavně Charles Darwin. Tito pánové se zasloužili o objev mikroorganismů, obecným přijetím fakta, že bakterie způsobují nemoci a objevem významu přirozeného a umělého výběru pro biologický vývoj a šlechtění. První adaptivní laboratorní evoluci provedl již asi před sto lety Dr. William Dallinger, který se rozhodl prozkoumat, zda je možné u organismu s krátkým životním cyklem vyvolat tepelně adaptivní změnu. Dallinger po dobu 7 let kultivoval rychle se množící prvoky za postupného zvyšování teploty. Experiment začínal na 16 °C a po 7 letech skončil na 70 °C. Dallinger si také všiml, že po adaptovaní prvoci nezvládají navrácení zpět na teplotu 16 °C, což naznačovalo, že adaptace na vysoké teploty vedlo ke ztrátě schopnosti přežít v teplotách nižších. Ačkoliv tomuto experimentu chybělo mnoho prvků, které jsou dnes považovány za nezbytné při studiu evolučního inženýrství, byl v té době považován za důležitou demonstraci evoluce jako takové [90]. V poslední době množství podobných experimentů přibývá, hlavně v posledních asi 25 letech, kdy jsou nejvíce zkoumanými mikroorganismy *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae*. Za zmínku stojí především dlouhodobá studie profesora R. Lanskiego a jeho výzkumného týmu z Michiganské státní univerzity. Tento experiment paralelní adaptace *Escherichia coli* na glukózu překračuje již 50 000 generací [83; 91].

2.3.2 Postupy evolučních experimentů

Většina experimentů evolučních studií začíná u klonálních, nebo inbredních populací modelového organismu. Existuje tedy homogenní a charakterizovaný výchozí bod. Pro pochopení evoluční dynamiky je velice užitečná znalost rychlostí, s nimiž vznikají nové mutace vedoucí ke genetické a fenotypové rozmanitosti v populaci. Rychlost mutací se může v průběhu evolučního času měnit, je tedy dobré mít informace, jak na tuto rychlost působí genetické a environmentální faktory [92].

V evolučním inženýrství existují tři hlavní způsoby užívané k množení organismů (Obr. 9). Všechny tyto způsoby vedou ke vzniku různých typů genetické dynamiky. První způsob představuje kultivace na pevných agarových plotnách. Jedná se o jediný z experimentů založený na akumulaci mutací, které přinášejí náhled na účinky nových mutací a rychlost jejich vzniku. Z narostlých mateřských kolonií se vždy vybere pouze jedna, nebo pár dalších kolonií, které se přenesou na nové agarové plotny pro další stupeň kultivace. Kultivace na pevném

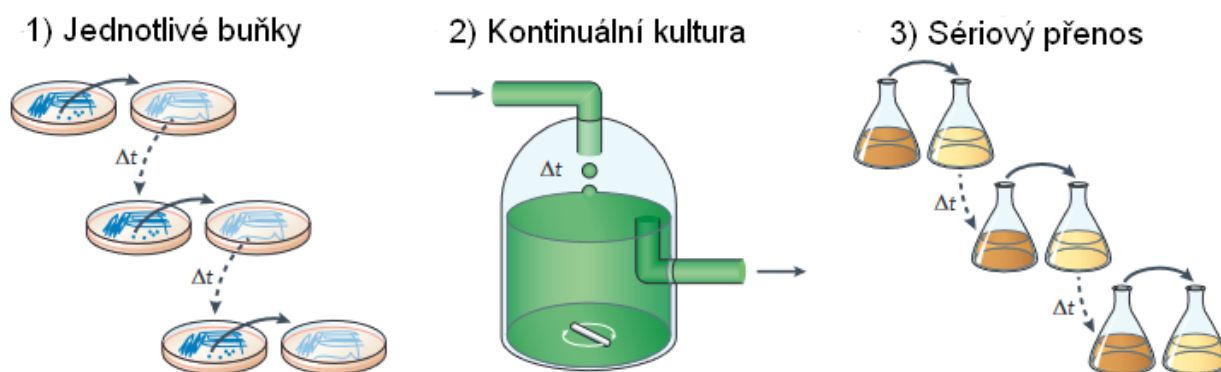
médiu neumožňuje mísení jednotlivých kolonií, čímž se odstraňuje genetická rozmanitost vedoucí k tvorbě nových mutací bez ohledu na jejich přínosný vliv pro populaci. Za těchto konkrétních podmínek lze jednoduše spočítat množství genetických změn přítomných v nezávisle se vyvíjejících genomech u známého počtu generací a odhadnout tak rychlost spontánní mutace. Obecným závěrem studií zabývajících se touto problematikou je, že rychlosti tvorby spontánních mutací jsou velice nízké [92].

Dalším způsobem provedení evolučních experimentů, tentokrát založených na adaptivním vývoji, je kontinuální (chemostatické) kultivace v bioreaktorech (chemostatech). V experimentech využívajících kontinuální kultivaci dochází k neustálému přísunu živin a odplavu náhodných jedinců společně s odpadem chemostatu, což vede k adaptivní evoluci a značné genetické rozmanitosti i v populacích, které obvykle udržují konstantní velikost [92]. Kultivace v bioreaktorech představuje výhodu především v konstantní rychlosti růstu a hustotě populace, která je mnohem větší oproti způsobům s omezenými podmínkami. Dále je možné přesně kontrolovat zásobování živinami a podmínky prostředí, jako je pH a množství kyslíku. Hlavní nevýhodou kontinuální kultivace jsou vysoké náklady. I při malých nádobách (3 l) a paralelním provozu, který je k dispozici u mnohých výrobců, jsou náklady mnohem vyšší, než u ostatních způsobů provedení [93].

Poslední možností provedení evolučních experimentů je sériový přenos v baňkách, řadící se taktéž do skupiny založené na adaptivním vývoji. V tomto typu experimentu se část populace periodicky přenáší (obvykle denně) na čerstvé médium a nechá se znovu narůst, dokud nedojde k vyčerpání omezující živiny. Takovýto růst také vede k adaptivní evoluci, jelikož je při každém přenosu udržována genetická rozmanitost [92]. Tato snadná technika má výhody v levném vybavení a snadném získání masivních paralelních kultur. Zároveň lze při sériovém přenosu snadno kontrolovat faktory prostředí, jako je teplota a homogenita kultury. Robustní baňky je možné nahradit destičkami s hlubokými jamkami s ještě menším objemem pro paralelní pěstování až stovek mikrobiálních kultur. Kultivace v baňkách má však stejně jako ostatní metody své nedostatky. Hlavním nedostatkem je měnící se hustota populace, kolísání rychlosti růstu, omezené zásobování živinami a kolísání podmínek prostředí, jako je pH a obsah kyslíku. V mnoha případech nemusí tyto omezení představovat překážku pro nastavení experimentu, ale jednoduchost procesu může znemožnit implementaci složitějších prostředí pro experimenty s mikrobiálním výběrem [94].

Akumulace mutací

Adaptivní laboratorní evoluce



Obr. 9: Způsoby provedení evolučních experimentů, převzato, upraveno [92]

2.3.3 Adaptace cyanobakterií na stresové faktory

V přírodě i v biotechnologickém prostředí čelí mikroorganismy různým změnám podmínek, jako jsou výkyvy teploty, pH, atmosférického a hydrostatického tlaku nebo výkyvy v množství kyslíku. Mikrobiální buňky vyvinuly mechanismy pro úspěšné zvládnutí rozmanitých stresových podmínek a udržení buněčné homeostázy. Na rozdíl od přirozeného prostředí mohou být v průmyslových procesech buňky vystaveny nepřirozeným stresům, které mohou mít za následek špatný výkon celého procesu [95]. Mnoho studií evolučního inženýrství zkoumalo dopad stresů na mikrobiální buňky a jejich pozdější adaptaci, což vedlo k získání nových informací o vzniku specialistů a základních mutací, a použitelnosti nově vyvinutých buněk pro průmyslovou mikrobiologii [83].

Jak již bylo výše popsáno, cyanobakterie obývají téměř každý kout naší planety. V rozdílných enviromentálních podmínkách musí buňky sinic čelit různým druhům stresů a deprivace, které ohrožují jejich růst a životaschopnost. Pro přizpůsobení a přežití vyvinuly cyanobakterie několik adaptivních odpovědí vyvolávajících na přítomný stres vhodné reakce [96]. Vzhledem k tomu, že sinice vyžadují ke svému růstu sluneční energii, je vnímání světla a vznik fyziologických změn, jako odpověď na měnící se světelnou intenzitu důležitou adaptační reakcí. Součástí hlavního systému adaptace na světlo jsou fykobilizomy [97]. Několik kmenů je dokonce schopno měnit složení svých fykobilizomů v reakci na kvalitu světla prostřednictvím mechanismu známého jako komplementární chromatická aklimatizace [98]. Pohyblivé druhy kromě toho používají k pohybu směrem optimálních světelných podmínek proces fototaxe [99]. Jednou ze složek slunečního záření je také pro organismy škodlivé UV-B, dopadající na povrch Země v důsledku oslabené ozonové vrstvy. UV-B indukuje přímé poškození proteinů a nukleových kyselin a nepřímé oxidační poškození biomolekul, což vede k vážné ztrátě fotosyntetických schopností, omezení rychlosti růstu a snížení schopnosti přežití [100]. Na zástupcích *Synechocystis* sp. PCC 6803, *N. commune* a *Anabaena* byly studovány změny v proteomu po vystavení UV-B záření. Bylo zjištěno, že krátkodobá šoková reakce postihuje membránu a proteiny s membránou spojené, zatímco dlouhodobé vystavení záření primárně mění cytoplazmatické proteiny. Je zřejmé, že cyanobakteriální adaptace na UV-B

stres spočívá v modifikaci membrány, cytosolických proteinů a metabolitů podporujících růst buňky [101; 102].

Jestliže ve fotosyntetických organismech intenzita přenosu elektronů řízených světlem překonává rychlost spotřeby elektronů během fixace CO_2 , jsou nevyhnutelně generovány reaktivní formy kyslíku (ROS), jako je samostatná molekula kyslíku ($^1\text{O}_2$), hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), superoxidový anion (O_2^-) a peroxid vodíku (H_2O_2). Stav nerovnováhy, kdy hladina ROS převyšuje množství antioxidačních molekul, se nazývá oxidační stres. Sinice, stejně jako všechny živé organismy vyvinuly několik obranných systémů, které eliminují některé z těchto ROS. Jako obranný mechanismus může cyanobakteriím sloužit nefotochemické zhášení excitační energie prostřednictvím komplexu PS II, kdy dochází k okyselení lumenu thylakoidu, což má za následek modifikaci karotenoidu violaxantinu na zeaxantin, který lépe přijímá energii. V boji proti ROS se podílejí také enzymatické obranné mechanismy, jako je aktivita superoxid dismutázy, glutathion peroxidázy aj [96; 103].

Mikroorganismy se velice často musí potýkat také s osmotickým stresem způsobeným měnící se koncentrací anorganických iontů v životním prostředí. Toxicita solí omezuje procesy růstu, fotosyntézy, dýchání a buněčné metabolismy [102]. Vysoká koncentrace iontů v médiu vede k osmotické ztrátě vody a současněmu zvýšení anorganických iontů škodlivých pro makromolekuly v buňce. Naproti tomu při nízké koncentraci iontů proudí voda z okolního prostředí do buňky, což má za následek buněčnou lýzi. Biologické membrány jsou první, kdo vnímá změny prostředí a podle toho modifikují lipidové a proteinové složky. V boji s hypertonickým stresem byla pozorována změna poměru sterolů ku fosfolipidům v lipidové dvojvrstvě, což zvyšuje tuhost membrány a snižuje propustnost pro NaCl . Mimo tento obranný mechanismus sinice, stejně jako mnohá jiná nehalogenní prokaryota, reagují na osmotický stres hromaděním malých organických látek (osmolytů), často ve formě cukrů a sledováním aktivního exportu anorganických iontů [104; 105]. Mnoho studií, ve kterých bylo zkoumáno, jakým způsobem se *Synechocystis* adaptuje na stres solí prokázalo, že probíhající buněčné reakce jsou dynamické procesy vyskytující se na různých úrovních, včetně alosterické regulace aktivity několika transportérů a enzymů, jakožto i globální změny v procesu genové transkripce [106].

S výjimkou extrémofilních zástupců je většina mezofilních kmenů citlivá na teplotní výkyvy. Kolísání teploty ovlivňuje téměř všechny hlavní složky a funkce buněk v závislosti na době a intenzitě expozice [107]. Působením vysoké teploty jsou inhibovány procesy fotosyntézy a fixace dusíku, proto jsou molekulární reakce na teplotní šok zásadní. Mimo to zvýšení teploty způsobuje také nadměrnou tekutost lipidů a modifikaci proteinů, což vede k úniku iontů z membrány. Jako obranou reakcí na teplotní posuny indukují sinice expresi genů teplotního šoku (HSP). HSP jsou molekulární chaperony, nebo proteázy hrající hlavní roli v proteostáze a mají schopnost stabilizovat lipidové membrány [108]. Teplotní stres nemusí být vyvolán pouze vystavením mikroorganismu vysoké teplotě, ale může být způsoben vystavením teplotě nižší, než je optimum pro růst. Vystavení teplotám nižším, než je optimum pro růst má za následek snížení tekutosti buněčných membrán a efektivity transkripčních a translačních procesů. Cyanobakterie se při snížení teploty brání produkcí proteinů studeného šoku (CSP),

sloužících k navýšení transkripčních a translačních procesů, působením na sekundární nukleové kyseliny. Druhou odpovědí je indukce desaturovaných mastných kyselin, která vyvažuje snížení tekutosti membrány [109].

2.3.4 Aplikace evolučního inženýrství

Evoluční inženýrství se stalo cenným nástrojem v metabolickém inženýrství pro vývoj a optimalizaci kmenů a pro zlepšení mikrobiální zdatnosti prostřednictvím předvídatelných mechanismů. Aplikaci ALE lze rozdělit do pěti základních oblastí [88].

2.3.4.1 Optimalizace rychlosti růstu

Zatímco celková zdatnost mikroorganismů je velice komplexní záležitost závislá na mnoha faktorech, rychlost růstu je v experimentech ALE obecně z těchto faktorů nejdůležitější [110]. Ačkoliv jsou ostatní kategorie aplikací evolučního inženýrství více specializované, obohacování adaptivních mutantů by nebylo možné bez výhody růstu oproti původním kmenům [111]. Klíčovým důvodem pro použití mikroorganismů v biotechnologiích a výzkumu je jejich krátká doba reprodukce a ALE umožňuje vylepšení této žádoucí vlastnosti. Evoluční inženýrství již bylo použito k optimalizaci rychlosti růstu u různých mikrobiálních druhů, ke zmírnění růstových defektů nově vytvořených kmenů, nebo ke studiu jak a proč se rychlost růstu mění v průběhu evoluce. Mimo aplikaci pro navýšení rychlosti růstu, je ALE také možno použít jako techniku zaměřenou na výběr komponent rychlosti růstu omezujících [88].

2.3.4.2 Zvýšení tolerance stresu

V případě vystavení mikroorganismů stresu, reagují buňky aktivací stresových odpovědí. Tento buněčný stres může být způsoben nevhodným prostředím, které indukuje určitou formu nesprávné metabolické regulace, nebo po vystavení specifickým inhibičním chemikáliím a biomolekulám [88]. Studie evolučního inženýrství zkoumají adaptivní reakce na mnoho stresových faktorů prostředí, jako jsou různé úrovně pH, osmotický tlak, teplota, UV záření, inhibitory (nejčastěji produkty metabolismu) a nutriční stresory. Využití ALE k pochopení stresových reakcí a překonání inhibice růstu je jedna z nejpopulárnějších a historicky nejdůležitějších aplikací, zvyšující užitečnost a odolnost průmyslově cenných kmenů [112].

2.3.4.3 Utilizace substrátu

Pro uspokojivou produkci metabolitů a dalších produktů zajímavých pro průmyslovou aplikaci je nezbytná efektivní utilizace substrátu. Existuje přímá souvislost mezi celkovou kondicí organismu a schopností efektivně přijímat a metabolizovat omezující růstové živiny. Experimenty evolučního inženýrství s vhodně navrženými podmínkami prostředí nenápadně odhalují mutace vedoucí k silnému růstu na vybraných substrátech. Primární motivace pro zlepšení utilizace substrátu organismem spočívá v udržení aktuální tržní ceny [113]. ALE lze použít jako nástroj pro zlepšení utilizace substrátu a metabolismu, většinou vyrovnáním růstových inhibičních účinků toxických produktů, nebo fixací nesprávné regulace metabolické dráhy v neoptimálních růstových podmínkách [88].

2.3.4.4 Zvýšení výnosu

Maximalizace bioprodukce sledovaných metabolitů je obtížným úkolem a racionální přístupy výběru kmenů pro dosažení požadované produktivity často nestačí. Hlavní zdroj obtíží spočívá

v konfliktu mezi rychlým růstem kmene a pro celkovou kondici buňky nevhodnou přeměnou buněčných zdrojů na velké množství požadované suroviny. K překonání této překážky a optimalizaci produkce lze využít metod evolučního inženýrství se správným experimentální designem [88; 114].

2.3.4.5 Všeobecné objevy

Tím, že ALE umožňuje pozorování evolučních výsledků v kontrolovaném laboratorním prostředí, usnadňuje výzkum základních bioproců. Studie evolučního inženýrství přinesly nový pohled na důležité evoluční jevy, jako je klonální interference, rychlost a mechanismus vývoje mutace a reakce na genetické poruchy. ALE se používá také ke studiu základních aspektů biologie, jako jsou reakce regulačních genů na vnější stresory nebo na nové prostředí [88; 115].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V této diplomové práci byly jako ukázkové mikroorganismy použity cyanobakteriální kmeny *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192. Kmeny byly poskytnuty výzkumnou skupinou pod vedením Ass. Prof. Ines Fritz, PhD pracující pro University of Natural Resources and Life Science (Universität für Bodenkultur – BOKU, Wien), Vienna, Institute of Environmental Biotechnology, Tulln an der Donau, Rakousko.

3.1.2 Použité chemikálie

- Citrát železito-amonný, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Dimetyl sulfoxide, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Dusičnan sodný, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Dusičnan železnatý nonahydrát, Lach-Ner s.r.o.
- Etanol absolut., Sigma-Aldrich s.r.o.
- Etylendiamintetraacetát sodný, Lach-Ner s.r.o.
- Hydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o.
- Chlorid sodný, Lach-Ner s.r.o.
- Chlorid vápenatý dihydrát, Lachema a.s.
- Chloroform, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Kyselina benzoová, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Kyselina citronová, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Kyselina sírová, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Metanol, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Peroxid vodíku 30%, Lach-Ner s.r.o.
- Síran hořečnatý heptahydrát, Sigma-Aldrich s.r.o.
- Síran měďnatý pentahydrát, Lachema a.s.
- TES (Trace Elements Solution), BOKU, Tulln an der Donau
- SYTOX™ Blue Dead Cell Stain for flow cytometry, Thermo Fisher Scientific
- Uhličitan sodný, Sigma-Aldrich s.r.o.

Veškeré použité chemikálie byly v čistotě p.a. a vyšší.

3.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy, Boeco
- Centrifuga Hettich EBA 20, MANEKO
- Centrifuga MIKRO 200, Hettich
- Laminární box Aura mini, BioAir-Euroclone
- Lampa MASTER Colour CDM-T MW eco 230W/842 E40
- Nanofotometr P 300, Implen
- Magnetická míchačka Magnetic Sterrier MMS-3 000, BioSan

- Plynový chromatograf s FID (Trace 1 300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm), Thermo Scientific
- Průtokový cytometr NL-2 000, Cytex Bioscience, Cytex Flow Cytometry Products
- Předvážka EW 620-3NM, KERN
- Temperovaná třepačka Incubator 1 000, Heidolph
- Termoblok Block heater SBH 130D, Stuart
- Třepačka SHO-2D, Witeg Germany
- UV/VIS spektrofotometr Hitachi U3900H, Hitachi High Technologies America Inc.
- Vortex, Heidolph Reax Top
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Příprava médií

3.2.1 Příprava média M22O

V této práci byly porovnávány dvě kultivační média o různých složeních, jedním z nich bylo médium M22O.

Složení kultivačního média M22O:

- | | |
|---|----------|
| • NaNO_3 | 0,450 g |
| • $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ | 0,025 g |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,100 g |
| • $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,600 g |
| • TES | 1,500 ml |
| • Na_2CO_3 | 0,200 g |
| • K_2HPO_4 | 0,080 g |
| • Destilovaná voda | 1000 ml |

Složení roztoku stopových prvků TES:

- | | |
|---|----------|
| • H_3BO_3 | 0,509 g |
| • $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,150 g |
| • KI | 0,181 g |
| • $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,293 g |
| • $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,296 g |
| • $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,082 g |
| • $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,275 g |
| • $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,100 g |
| • $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,490 g |
| • $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 0,395 g |
| • $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 0,470 g |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

V prvním kroku přípravy byl v samostatné kádince s 500 ml destilované vody smíchán dusičnan sodný, nonahydrát dusičnanu železitého, heptahydrát síranu hořečnatého a dihydrát

chloridu vápenatého. Roztok byl ponechán po dobu 10 minut na magnetické třepačce. Do další kádinky bylo naměřeno 400 ml destilované vody, do které byl vmíchán uhličitan sodný a hydrogenfosforečnan draselný, roztok byl opět ponechán na magnetické míchačce do rozpuštění všech komponent. Po rozpuštění veškerých pevných složek byly roztoky za stálého míchání slity dohromady a byl přidán roztok stopových prvků TES. V konečném kroku došlo k doplnění celkového objemu na 1 000 ml a hotový roztok byl ponechán v lednici při 4 °C.

3.2.2 Příprava média BG-11

Jak bylo výše zmíněno v této práci byla použita dvě média. Druhé médium pro kultivaci cyanobakterií nese označení BG-11.

Složení roztoku 100x BG-11:

• NaNO ₃	149,60 g
• MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7,49 g
• CaCl ₂ · 2 H ₂ O	3,60 g
• Kyselina citronová	0,60 g
• NaEDTA	1,12 ml
• TES	100,00 ml
• Destilovaná voda	898,88 ml

Složení roztoku stopových prvků TES:

• H ₃ BO ₃	2,86 g
• MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,81 g
• ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,22 g
• Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,39 g
• CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,08 g
• Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	0,05 g
• Destilovaná voda	1 000 ml

Složení roztoku 1 000x citrát železito-amonný:

• Citrát železito-amonný	0,60 g
• Destilovaná voda	100,00 ml

Složení roztoku 1 000x Na₂CO₃:

• Na ₂ CO ₃	2,00 g
• Destilovaná voda	100,00 ml

Složení roztoku 1 000x K₂HPO₄:

• K ₂ HPO ₄	3,05 g
• Destilovaná voda	100,00 ml

Nejprve byly podle návodu připraveny zásobní roztoky 100x BG-11, 1 000x citrát železito-amonný, 1 000x uhličitan sodný a 1 000x hydrogenfosforečnan draselný. Pro přípravu konečného média bylo do 987 ml destilované vody napipetováno 10 ml zásobního roztoku 100x BG-11 a po 1 ml zbylých zásobních roztoků citrátu železito-amonného, uhličitanu sodného a hydrogenfosforečnanu draselného. Připravené médium bylo ponecháno v lednici při 4 °C.

3.2.3 Kultivace cyanobakterií

90 ml připraveného média bylo odměřeno do 250 ml Erlenmeyerových baněk a vysterilizováno po dobu 30 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo do čistého média zaočkováno v laminárním boxe 10 ml cyanobakteriální kultury. Po sterilním uzavření byla média s kulturami vložena na třepačku pod zdroj světla, kde probíhala kultivace při 23–26 °C, za světelného režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Rychlost třepání byla nastavena na 90 rpm a kultivace probíhala po dobu 30 dnů.

3.3 Experimenty evolučního inženýrství

V rámci experimentů adaptivní laboratorní evoluce jejichž cílem byl zisk adaptovaných kmenů, byly jako selekční tlaky prostředí zvoleny přídavky H_2O_2 a Cu^{2+} . H_2O_2 bylo zvoleno, jelikož se jedná o nejčastěji využívaný růstový inhibitor sinic způsobující oxidační stres. Výběr Cu^{2+} jako selekčního tlaku prostředí byl podmíněn tím, že se jedná o běžně se vyskytující kov a zároveň existují náznaky o vztahu mezi mědí a produkcí PHB u kmene *C. necator* H16 [116].

3.3.1 Adaptace na H_2O_2

Pro experiment adaptace cyanobakterií na peroxid vodíku bylo použito médium M22O, ve kterém proběhla kultivace mikroorganismů *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CICALA 192 (viz 3.2.3). Po 4 týdnech bylo do narostlých kultur v prostředí laminárního boxu přidáno vypočtené množství peroxidu vodíku tak, aby konečné koncentrace činily 50, 100 a 200 mmol (při použití 30% roztoku). Po přídavku byly kultury opět sterilně uzavřeny a vráceny na třepačku pod zdroj světla. Veškerá média byla v paralelním provedení a zároveň byly ke každé kultuře kultivovány kontroly bez přídavku peroxidu vodíku. Kultivace kultur takto probíhala po dobu 21 dnů.

3.3.2 Adaptace na Cu^{2+}

Pro experiment adaptace cyanobakterií na měď byla použita média M22O a BG-11. Do 250 ml Erlenmeyerových baněk bylo odměřeno 90 ml média, do kterého bylo přidáno vypočítané množství pentahydrátu síranu měďnatého tak, aby konečné koncentrace Cu^{2+} v médiu činily 10, 50 a 200 mg/l. Takto připravená média byla vysterilována po dobu 30 min a ochlazená na laboratorní teplotu. Po ochlazení bylo do médií v prostředí laminárního boxu zaočkováno 10 ml dané cyanobakteriální kultury a po sterilním uzavření byly baňky ponechány na třepačce pod zdrojem světla při laboratorní teplotě, 90 rpm a světelném režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Veškerá média byla připravena v paralelním provedení a ke každé kultuře byla kultivována kontrola bez obsahu mědi v médiu. Po 32. dnech bylo 10 ml z každé kultury, kromě kontrol, přeočkováno do 90 ml nového média s koncentrací Cu^{2+} 10 mg/l a nově zaočkováná média byla vložena na třepačku pod zdroj světla.

3.4 Vystavení cyanobakterií akutnímu stresu

Experimenty akutního stresování spočívaly ve vystavení kultury určitému selekčnímu tlaku po krátkou dobu (desítky minut až 24 h) a následném posouzení změny viability buněk. Vzorky byly vždy v paralelním provedení a ke každému měření byla připravena pozitivní kontrola čisté kultury bez vystavení selekčnímu tlaku a negativní kontrola vzniklá poškozením kultury po dobu 15 minut.

3.4.1 Tepelný stres

Do zkumavek typu Eppendorf o objemu 2 ml bylo v laminárním boxu odebráno po 1 ml kultury. Zkumavky byly poté vloženy do vodní lázně vytemperované na zvolenou teplotu (35, 40 a 45 °C) po dobu 30 minut. Po vychlazení byla u vzorků proměřena viabilita buněk.

3.4.2 Stres mrazem

V laminárním boxu byl napipetován 1 ml kultury do zkumavek typu Eppendorf o objemu 2 ml. Takto připravené vzorky byly vloženy do mrazicího boxu a ponechány zde po dobu nutnou k úplnému zmrazení média. Pro zkrácení doby nutné k zamrznutí byly zkumavky do boxu položeny vodorovně. Po úplném zamrznutí kultury byly veškeré vzorky rozmrazeny při laboratorní teplotě. Vzorky určené pro 1 cyklus mražení byly zpracovány a vzorky určené pro 2 cykly mražení byly vloženy zpět do mrazicího boxu. Po opětovném zamrznutí média byly vzorky rozmrazeny při laboratorní teplotě a zpracovány pro měření viability buněk.

3.4.3 Stres kationty Cu^{2+}

Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 600 mg/l Cu^{2+} rozpuštěním 23,58 g pentahydrátu síranu měďnatého ve 100 ml destilované vody. V laminárním boxu bylo do Erlenmeyerových baněk o objemu 25 ml napipetováno vypočtené množství kultury doplněné o roztok pentahydrátu síranu měďnatého tak, aby konečný objem vzorku činil 5 ml. Takto připravené vzorky byly umístěny na třepačku pod zdroj světla na předem určenou dobu působení stresového faktoru.

3.4.4 Osmotický stres chloridem sodným

V laminárním boxu byly do Erlenmeyerových baněk o objemu 25 ml napipetovány 3 ml cyanobakteriální kultury. Do kultury bylo naváženo vypočtené množství chloridu sodného tak, aby vznikly roztoky o koncentracích 10 a 20% obj. NaCl. Takto připravené vzorky byly vloženy na třepačku pod zdroj světla, kde probíhalo působení stresového faktoru po dobu 2 hodin.

3.4.5 Stres peroxidem vodíku

V prostředí laminárního boxu bylo do Erlenmeyerových baněk o objemu 25 ml napipetováno vypočtené množství kultury a peroxidu vodíku (30% roztok) v poměrech odpovídajících koncentraci 10% obj. H_2O_2 , kdy konečný objem vzorku činil 5 ml. Takto vytvořené vzorky byly vloženy na třepačku pod zdroj světla, kde probíhalo působení stresového faktoru po dobu 2 hodin.

3.4.6 Stres ethanolem

V laminárním boxu byla do Erlenmeyerových baněk o objemu 25 ml napipetována kultura a roztok absolutního ethanolu v poměrech odpovídajících koncentraci 10% obj. EtOH

a o konečném objemu vzorku 5 ml. Takto připravené vzorky byly vloženy na třepačku pod zdroj světla na dobu 2 hodin.

3.5 Stanovení biomasy

Obsah biomasy v jednotlivých vzorcích byl stanovován jak gravimetricky, tak spektrofotometricky. Stanovení obsahu biomasy probíhalo vždy při ukončení experimentu, popřípadě probíhalo stanovení v pravidelných intervalech po celý čas kultivace v závislosti na typu experimentu. Ve vysušené biomase byl následně stanoven obsah polyhydroxyalkanoátů.

3.5.1 Spektrofotometrické stanovení obsahu biomasy

Při spektrofotometrickém stanovení biomasy je měřeno množství světla o určité vlnové délce absorbovaného vzorkem. Příprava vzorků probíhala napipetováním kultury přímo do kyvety o objemu 2 ml. Kyveta byla vložena do spektrofotometru a proběhlo proměření absorbance při vlnové délce 485 nm, rovnající se vlnové délce absorbance chlorofylu. Jako blank bylo použito čisté médium, v případě vzorků obsahujících pentahydrát síranu měďnatého byla do média pro blank přidána stejná koncentrace, jako nacházející se ve vzorku. V případě potřeby byly vzorky naředěny čistým médiem tak, aby absorbance nepřesahovala číslo 1. Veškeré měření proběhlo ve třech paralelních provedeníh.

3.5.2 Gravimetrické stanovení biomasy

Pro gravimetrické stanovení biomasy bylo z každého vzorku napipetováno 10 ml do dvou centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly vloženy do centrifugy a stočeny po dobu 15 minut při 3 461 g. Následně byl slit supernatant a vzniklý pelet byl rozsuspendován v 1 ml destilované vody. Následovalo opětovné stočení po dobu 5 minut při 3 461 g. Po stočení byl supernatant slit a otevřené centrifugační zkumavky byly vloženy do sušárny nastavené na teplotu 70 °C. Biomasa byla sušena do konstantní hmotnosti a po vysušení byla zvážena na analytických vahách. Zpětně proběhlo vyhodnocení koncentrace biomasy v původních vzorcích v g/l.

3.6 Stanovení obsahu PHA v biomase

Stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů v suché biomase bylo provedeno pomocí plynové chromatografie s FID (plamenový ionizační) detektorem.

3.6.1 Příprava kalibračních roztoků pro plynovou chromatografii

Do pěti předem připravených krimpovacích vialek o objemu 2 ml byl na analytických vahách navážen práškový PHB standard v rozmezí 3–10 mg. Tyto navážky následně odpovídaly bodům kalibrační závislosti. V prostředí digestoře byl ke standardu napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi (15% kyselina sírová v methanolu a 5 mg/ml vnitřního standardu, kyseliny benzoové). Vialky byly uzavřeny, protřepány a po dobu 3 hodin udržovány v termobloku při teplotě 94 °C. Po vyjmutí z termobloku byly směsi ochlazeny při laboratorní teplotě a poté zneutralizovány ve šroubovacích vialkách o objemu 4 ml obsahujících 0,5 ml 0,05 M NaOH. Po protřepání a oddělení fází bylo do nových šroubovacích vialek o objemu 2 ml napipetováno vždy 950 µl izopropanolu a 50 µl spodní chloroformové fáze obsahující methylestery 3-hydroxyalkanových kyselin. Vialky byly okamžitě zašroubovány a roztoky následně analyzovány pomocí plynové chromatografie.

3.6.2 Příprava vzorků pro plynovou chromatografii

Do předem připravených krimpovacích vialek bylo naváženo přibližně 10 mg vysušené biomasy. V prostředí digestoře bylo stejně jako v kapitole 3.6.1 ke vzorkům přidáno 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsy skládající se z 15% kyseliny sírové v methanolu a 5 mg/ml ISTD, kyseliny benzoové. Vzorky byly uzavřeny, protřepány a vloženy do termobloku, kde probíhal proces esterifikace po dobu 3 hodin při teplotě 94 °C. Po ukončení esterifikace byly vzorky vyjmuty, ochlazeny na laboratorní teplotu a neutralizovány v 0,5 ml 0,05 M roztoku hydroxidu sodného. Po oddělení fází bylo do nových šroubovacích vialek napipetováno 950 µl izopropanolu a 50 µl spodní chloroformové fáze. Vzorky byly nakonec zavičkovány a společně se standardy analyzovány na plynovém chromatografu.

3.7 Stanovení viability buněk metodou průtokové cytometrie

Viabilita (životaschopnost) cyanobakteriálních buněk po vystavení stresovým faktorům byla sledována metodou průtokové cytometrie. Jedná se o technologii, pomocí které dochází k rychlé analýze jednotlivých buněk nebo částic suspendovaných v roztoku. Jednotlivé buňky v průběhu měření prochází paprskem jednoho, nebo více laserů a následně dochází k analýze rozptýleného záření a vzniklé fluorescence. Detekce rozptýleného světla probíhá ve dvou směrech, a to ve směru přímém vzhledem ke zdroji záření (160–180°) a ve směru kolmém vzhledem ke zdroji záření (90°). Data získaná z přímého směru rozptylu vzhledem ke zdroji záření udávají informace o velikosti buňky a data získaná z kolmého směru vzhledem ke zdroji světla udávají vnitřní složitost buňky. Metoda průtokové cytometrie již našla své uplatnění v oborech, jako jsou imunologie, virologie a molekulární biologie [117].

3.7.1 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

Vzorky byly připraveny v paralelním provedení napipetováním 1 ml kultury do zkumavek typu Eppendorf. Kultura byla následně vložena do centrifugy a stočena po dobu 3 min při 2656 g. Po ukončení centrifugace byl odpipetován supernatant a vzniklý sediment byl promytý 1 ml PBS pufru*. Do nových zkumavek typu Eppendorf byla připravena 50krát zředěná kultura smícháním 980 µl PBS pufru a 20 µl promyté kultury. Z mrazicího boxu byla vyjmuta mikrozkušavka obsahující barvivo SYTOX™ Blue Dead Cell Stain, které bylo v temnu rozmrazeno při laboratorní teplotě. Do připravených vzorků bylo napipetováno 0,5 µl rozmrazeného barviva a takto připravené kultury byly ponechány po 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

Následně byly všechny vzorky proměřeny na průtokovém cytometru s použitím fialového kanálu V4, rozsahu vlnových délek 466–481 nm a nastavením pro měření 10 000 událostí.

*Složení PBS pufru (pH 7,4):

- | | |
|---|----------|
| • NaCl | 8,00 g |
| • KCl | 0,20 g |
| • Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 1,44 g |
| • KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

3.8 Stanovení cyanobakteriálních barviv

3.8.1 Stanovení cyanobakteriálních barviv metodou UV-VIS spektroskopie

Příprava vzorku pro měření na UV-VIS spektrofotometru spočívala v přímém napipetování 3 ml kultury do křemenné kyvety. Kyveta byla vložena do přístroje a proběhlo měření v rozmezí vlnových délek 900–200 nm s krokem 0,5 nm a v difúzně transmisním módu (integrační koule). Jako blank byl použit PBS pufr (kapitola 3.7).

3.8.2 Stanovení cyanobakteriálních barviv extrakcí

Pro předejití degradace vyextrahovaných pigmentů probíhal celý tento experiment při tlumeném světle. Do zkumavek typu Eppendorf byl napipetován 1 ml cyanobakteriální kultury, který byl vložen do centrifugy a stočen při 15 000 g po dobu 7 minut. Po stočení byl slit supernatant a k peletu byl přidán 1 ml methanolu předchlazeného na teplotu 4 °C. Vzorek byl zhomogenizován pomocí vortexu, přikryt alobalem a vložen na 20–60 minut do lednice o teplotě 4 °C. Následně byla kultura vložena do centrifugy a stočena při 15 000 g po dobu 7 minut. Vizualně byl zkontrolován pelet, zda je jeho barva nafialovělá, a naopak není vidět žádný náznak zelené. V případě přítomnosti zelené barvy byl zopakován krok homogenizace a inkubace v lednici. Takto připravené vzorky byly proměřeny na spektrofotometru při vlnových délkách 470, 665 a 720 nm. Jako blank byl použit methanol. Všechny vzorky byly v paralelním provedení.

Koncentrace chlorofylu *a* a karotenoidů ve vzorku byla poté vypočtena pomocí následujících rovnic:

$$c_m(\text{Chl}_a) = 12,9447 \cdot (A_{665} - A_{720}) [\mu\text{g/ml}] \quad (1)$$

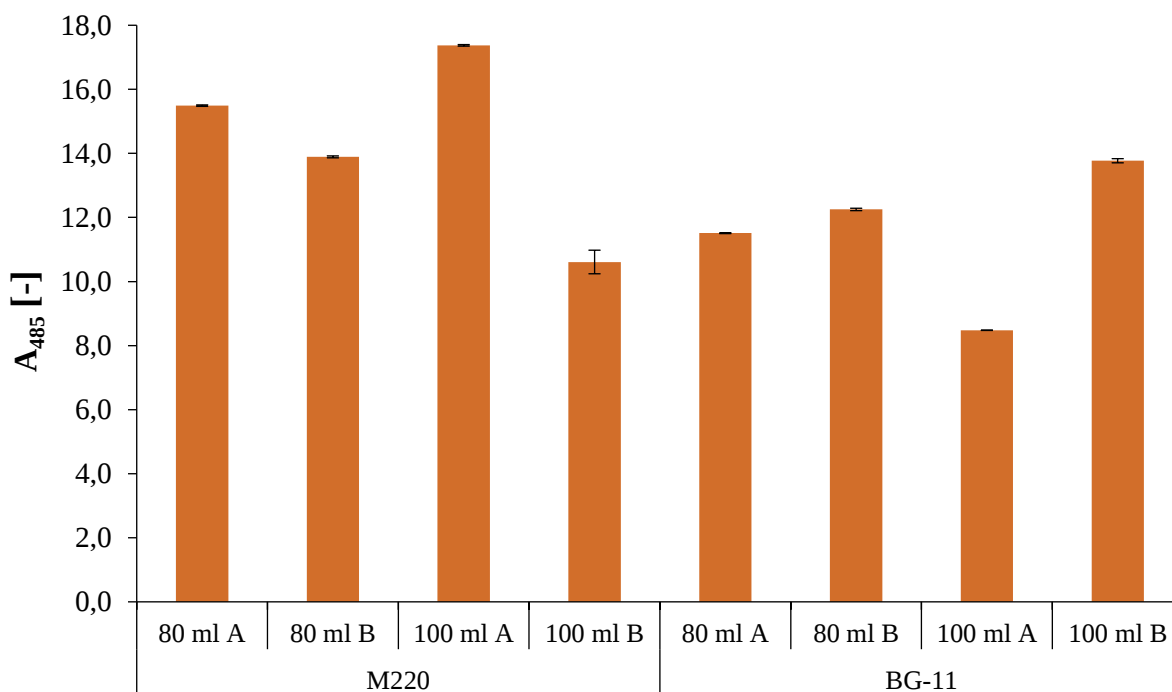
$$c(\text{Chl}_a) = 14,4892 \cdot (A_{665} - A_{720}) [\mu\text{m}] \quad (2)$$

$$c_m(\text{Karotenoidy}) = [1,000 \cdot (A_{470} - A_{720}) - 2,86 \cdot (\frac{c_m \text{Chl}_a}{221})] [\mu\text{g/ml}] \quad (3)$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace média

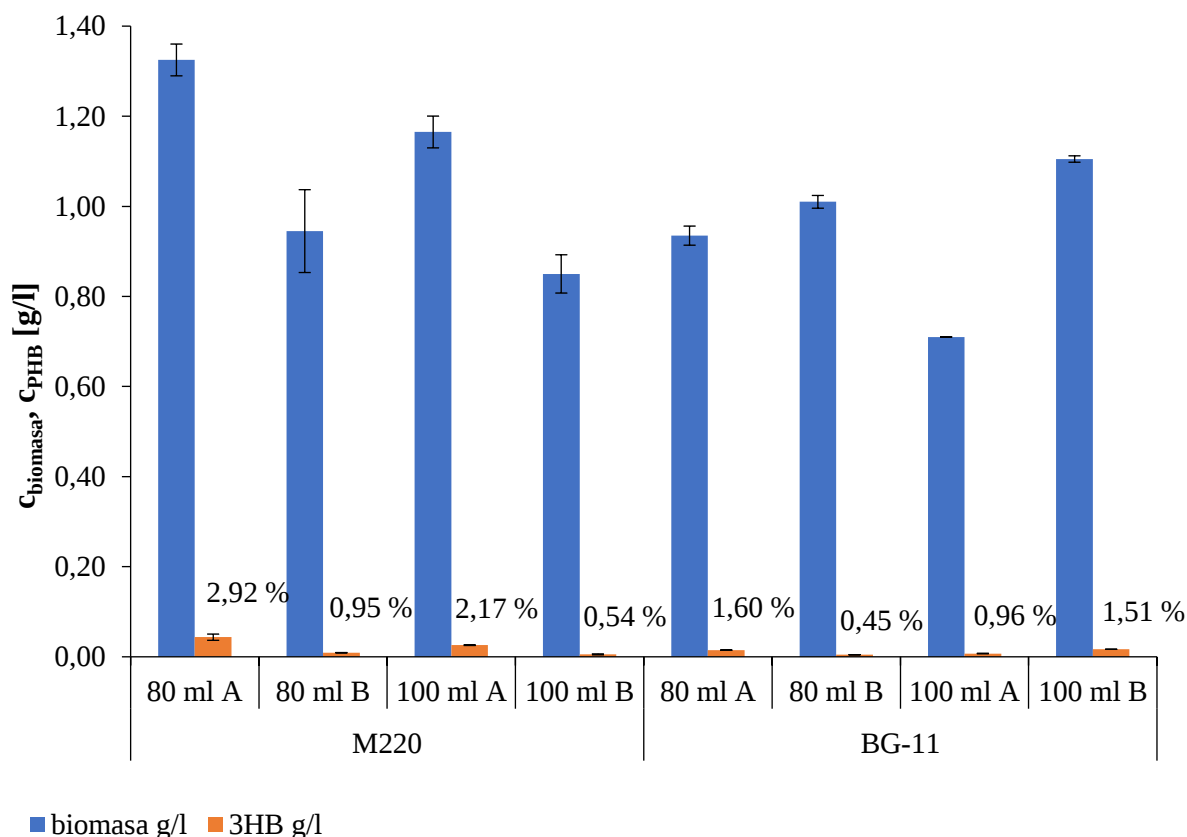
I přesto, že cyanobakterie jsou odolné a rostou v široké škále prostředí je potřeba jejich podmínky růstu zoptimalizovat, aby celý proces kultivace probíhal rychle a efektivně s minimálními náklady. Pro maximální výtěžky proběhla optimalizace médií, kdy byl pozorován nárůst kmenů *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 ve dvou různých médiích a v různých objemech. Složení obou použitých médií M220 a BG-11 je popsáno v kapitole 3.2. Nárůst biomasy byl pozorován po 30 dnech kultivace jak spektrofotometrickou, tak gravimetrickou metodou a zároveň bylo také posouzeno za jakých podmínek produkují kmeny největší množství polyhydroxyalkanoátů. Po ukončení kultivace obou kmenů se projevil problém s kmenem *Synechosystis salina* CCALA 192, jehož nárůst nebyl vizuálně zaznamenán v žádném z připravených médií a přítomnost biomasy nebyla později zaznamenána ani jinou metodou. Neschopnost cyanobakteriální kultury růst mohla být způsobena nekvalitní zaočkovávací kulturou. Optimální médium bylo tedy vyhodnoceno pouze z kultivace kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803.



Obr. 10: Výsledné hodnoty absorbancí kultury *Synechocystis* sp. PCC 6803 na různých typech médií a v různých objemech

Na Obr. 10 je možné pozorovat výsledky spektrofotometrického stanovení biomasy, na kterých médiu M220 vykazuje větší nárůst kultury než médium BG-11. Jako nejvhodnější objem pro kultivaci se z naměřených hodnot jeví 100 ml média, kde naměřená absorbance odpovídala hodnotě 17,37. Tvzení o optimálnosti média a objemu se však dá zpochybnit velkým rozdílem v naměřených hodnotách u paralelních vzorků. Důvodem, proč má paralelní vzorek 100 ml B u kultury M220 nižší hodnotu je princip spektrofotometrického stanovení cyanobakteriální kultury, které probíhá na základě měření absorbancí při vlnové délce 485 nm, což odpovídá

vlnové délce absorbance chlorofylu. Kultura ve vzorku M22O 100 ml B však již po 30ti dnech přecházela do fáze chlorózy, kdy měnila barvu ze zelené na hnědou a docházelo k úbytku chlorofylu a nadbytku karotenoidů. Stanovení obsahu biomasy na základě měření vlnové délky chlorofylu je tedy v tomto případě velice nepřesné. Pro přesnější měření by mohla být použita vlnová délka 750 nm, při níž se zabráni absorpci pigmenty, ale ještě lepší alternativou je gravimetrické stanovení suché hmoty buněk, které je obsahem Obr. 11 [118].



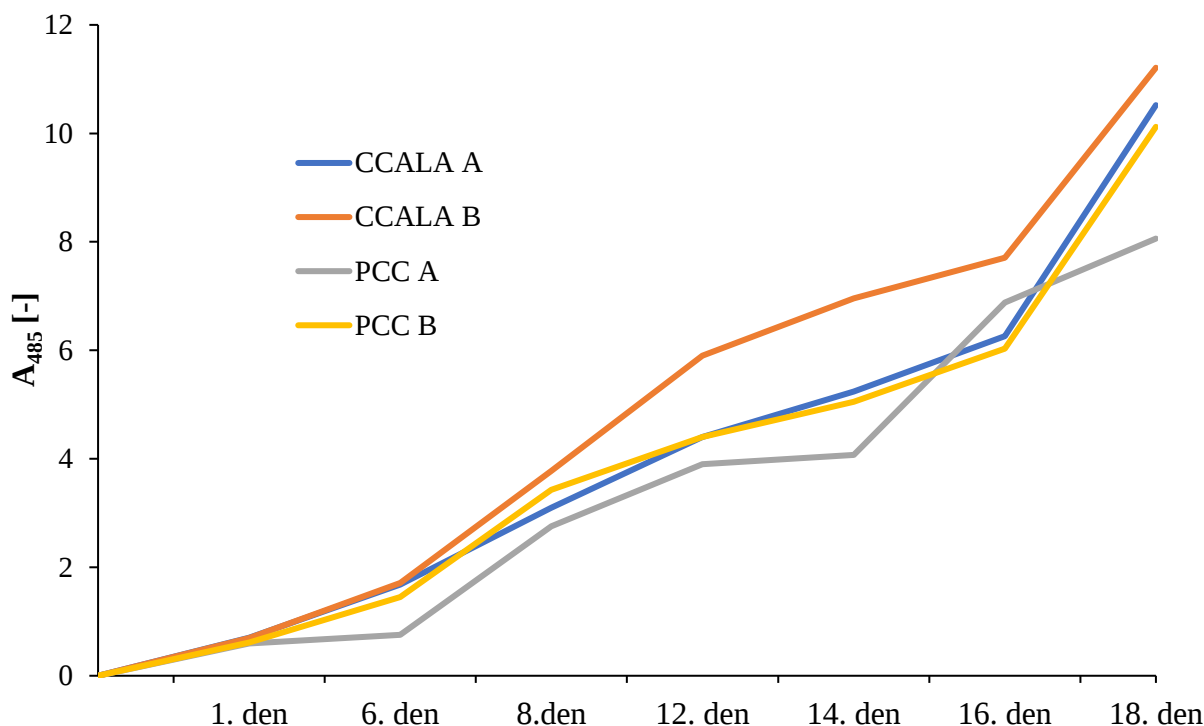
Obr. 11: Stanovení množství biomasy a PHA v různých médiích a v různých objemech

V porovnání se spektrofotometrickým stanovením biomasy, kde se jako nejvhodnější kombinace podmínek zdálo médium M22O o obsahu 100 ml, z výsledků gravimetrického stanovení biomasy, které můžeme vidět na Obr. 11, vystupuje jako nejlepší kombinace médium M22O o objemu 80 ml. Množství biomasy v tomto médiu bylo stanoveno na 1,33 g/l a i obsah polymeru PHB zde byl ze všech vzorků nejvyšší, konkrétně 2,92 %. U gravimetrického stanovení biomasy dále není tak markantní rozdíl, co se týče srovnání obou médií, jako se zdálo u stanovení pomocí měření absorbancí. Paralelní vzorky jsou však i v tomto případě velice odlišné, jelikož na růst kultur má vliv spousta okolních faktorů, jako je umístění na třepačkách, manipulace s baňkami, vedlejší zdroje světla aj. Nedá se tedy s jistotou určit, která kombinace vede k nejefektivnějšímu růstu biomasy, ze získaných dat se však dá říci, že médiu M22O bylo pro kultivaci kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803 vhodnější.

4.2 Adaptivní laboratorní evoluce využívající peroxid vodíku

Jedním ze selekčních tlaků použitých pro experimenty evolučního inženýrství u cyanobakterií *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 byl peroxid vodíku. Peroxid vodíku byl zvolen jako selekční tlak, jelikož se jedná o velmi často používanou nouzovou metodu pro potlačení květů sinic ve sladkovodních jezerech. Při působení H_2O_2 na cyanobakteriální buňky dochází k velkému poškození ve fotosystému II (PSII) a zmenšení velikosti buněk [119].

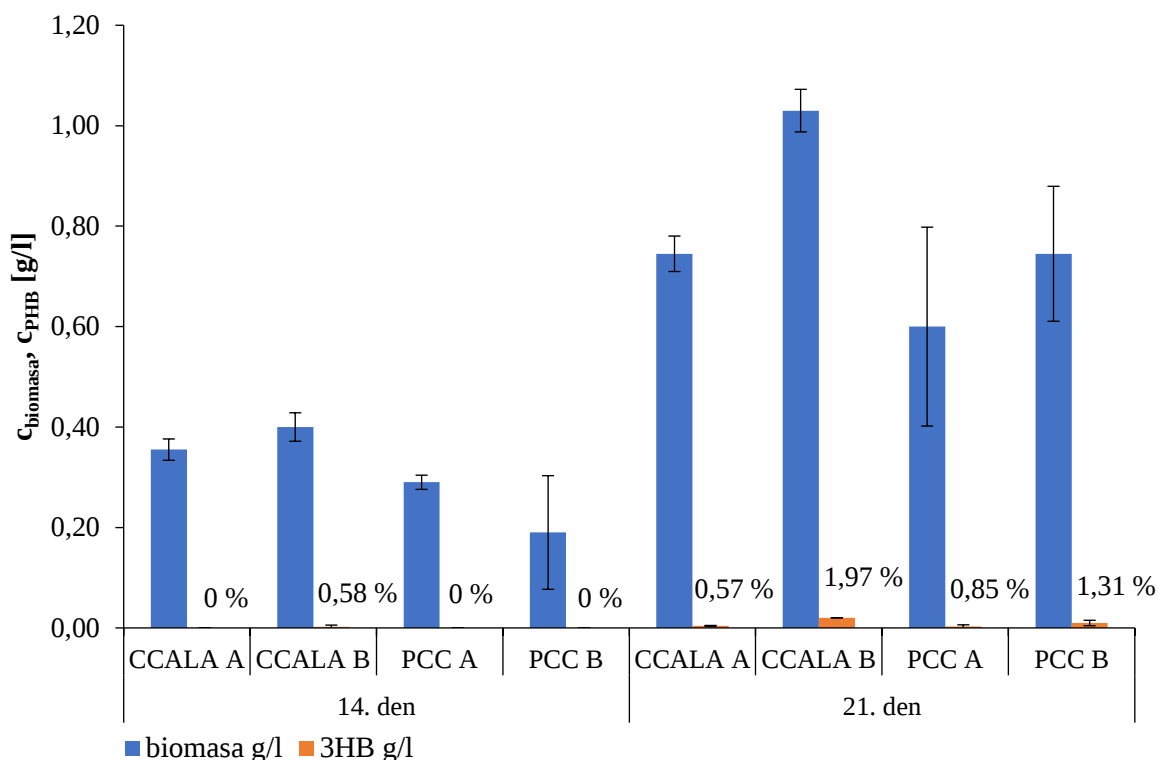
Příprava experimentu adaptivní laboratorní evoluce využívající peroxid vodíku byla popsána v kapitole 3.3.1. V tomto experimentu se prokázalo, že peroxid vodíku je opravdu silným inhibítorem, co se růstu cyanobakteriálních kultur týče, jelikož po jeho přidání do plně narostlých kultur došlo během 4 dnů k naprostému úhynu. H_2O_2 se tedy jeví pro experimenty evolučního inženýrství nevhodný. I vzhledem ke ztrátě veškerých kultur určených k adaptaci, byly kontrolní kultury tohoto experimentu použity pro zaučení na jednotlivých přístrojích využitých pro analýzu budoucích experimentů.



Obr. 12: Růstové křivky cyanobakteriálních kmenů *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192

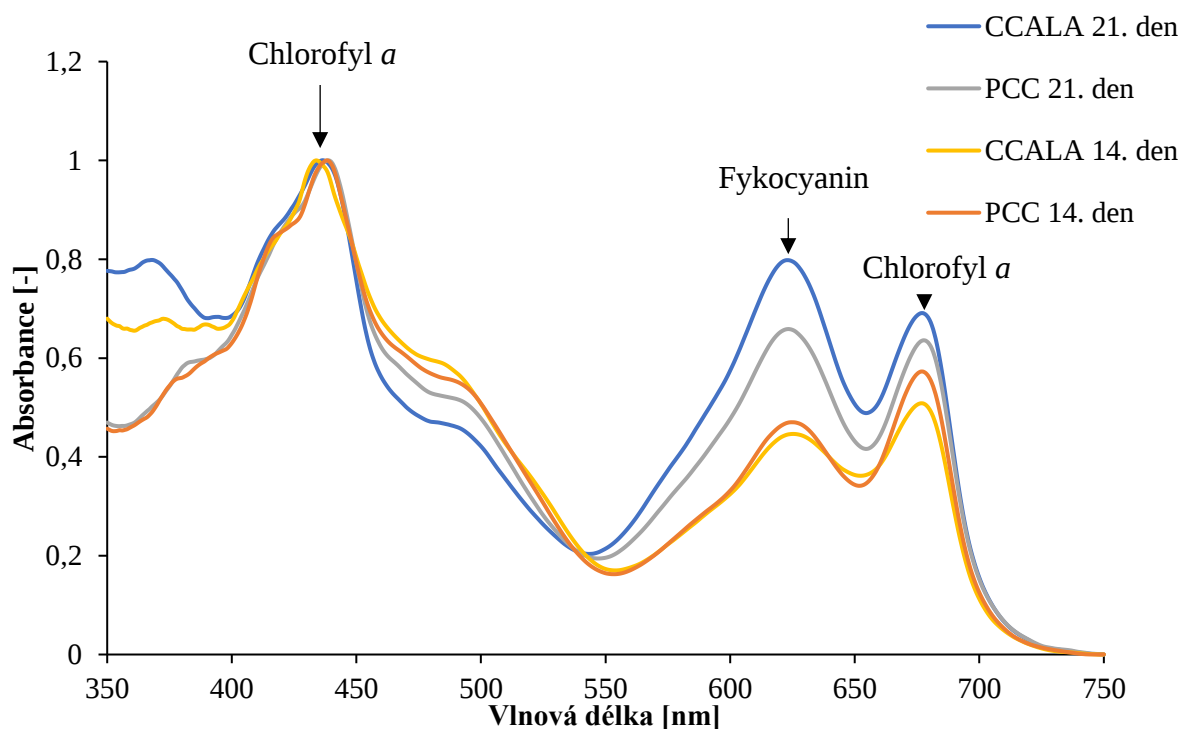
Na Obr. 12 můžeme pozorovat růstovou křivku jednotlivých cyanobakteriálních kmenů utvořenou z hodnot absorbancí měřených po dobu 18. dní. Ze získaných dat vyplývá, že oba kmeny mají velice podobné rychlosti nárůstu kultury, kdy především v 16. den můžeme vidět u obou kultur rapidní nárůst obsahu chlorofylu. Stejně jako u předchozího experimentu je i zde možné pozorovat citlivost kultur na vlastnosti prostředí, kdy i paralelní vzorky u kmene *Synechocystis sp.* PCC 6803 mají dosti rozdílné tvary růstových křivek. Tento rozdíl je opět

způsoben nástupem vzorku PCC A 16. den do fáze chlorózy, kde docházelo k poklesu barviva chlorofylu a kultura měnila barvu ze zelené na hnědou.



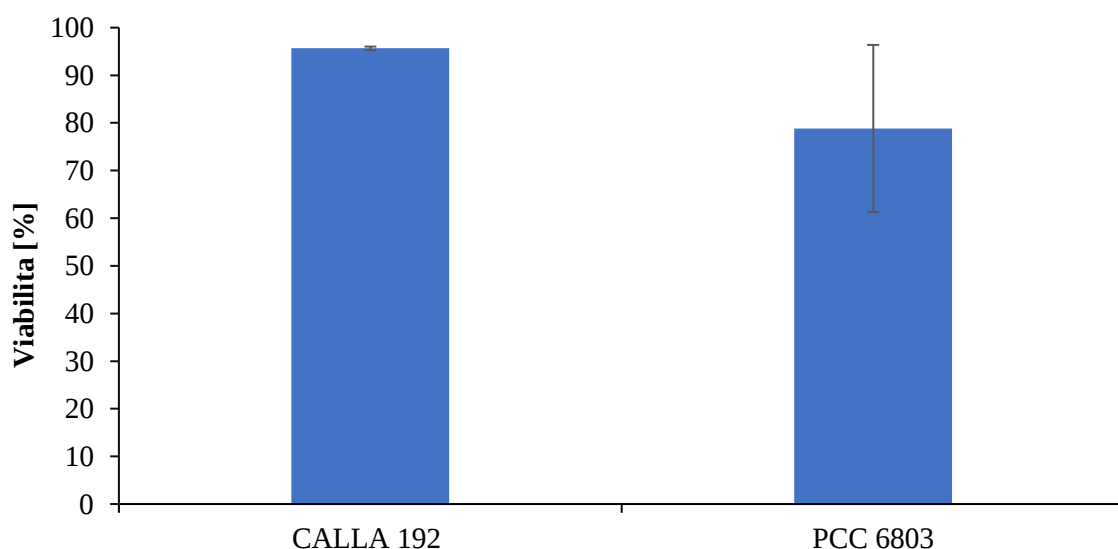
Obr. 13: Stanovení množství biomasy a PHA u cyanobakteriálních kmenů *Synechocystis* sp. PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 po 14. a 21. dnech kultivace

Jak je možné vidět na Obr. 13 gravimetrické stanovení biomasy u cyanobakteriálních kontrol v tomto případě odpovídá stanovení spektrofotometrickému. Stejně jako u stanovení pomocí měření optické hustoty je největší koncentrace biomasy pozorována u kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 a to konkrétně 0,40 g/l po 14 dnech měření a 1,03 g/l po 21 dnech měření. Tentýž vzorek zároveň obsahoval v suché biomase nejvíce PHA a to konkrétně 0,58 % po 14 dnech a 1,97 % po 21 dnech. U ostatních kultur můžeme sledovat pomalý nárůst biomasy a neschopnost tvorby PHA, na jehož akumulaci neměly cyanobakterie do 14. dne kultivace dostatečné množství chlorofylu pro autotrofní tvorbu uhlíku. Po 14. dnech s nárůstem kultury a zrychlením procesu fotosyntézy již mikroorganismy přešly do fyziologického stavu, kdy byly schopny akumulovat PHA. Na vzorku *Synechocystis* sp. PCC 6803 B můžeme pozorovat největší rychlost nárůstu jak biomasy, tak akumulovaného množství PHA a ukázkově demonstruje, že kultura vstupující do fáze chlorózy je obecně na množství akumulovaného polymeru bohatší než u kultura bohatá na chlorofyl.



Obr. 14: UV-VIS spektrum cyanobakteriálních kultur 14. a 21. den kultivace

Mezi důležitou součástí cyanobakterií nezbytnou pro schopnost procesu fotosyntézy jsou buněčná barviva. Na Obr. 14 je zobrazen rozdíl UV-VIS spekter cyanobakteriálních kontrol ve 14. a 21. dnu kultivace. Spektra obou kmenů jsou si velice podobná, což naznačuje přítomnost stejných pigmentů v podobném množství. Mezi detekovaná barviva u všech vzorků patří barviva fotosyntetická, a to chlorofyl *a* a fykocyanin. U mladších méně narostlých kultur můžeme pozorovat výrazně nižší obsah jednotlivých pigmentů, jejichž množství se zvyšuje se stárnutím kultury.



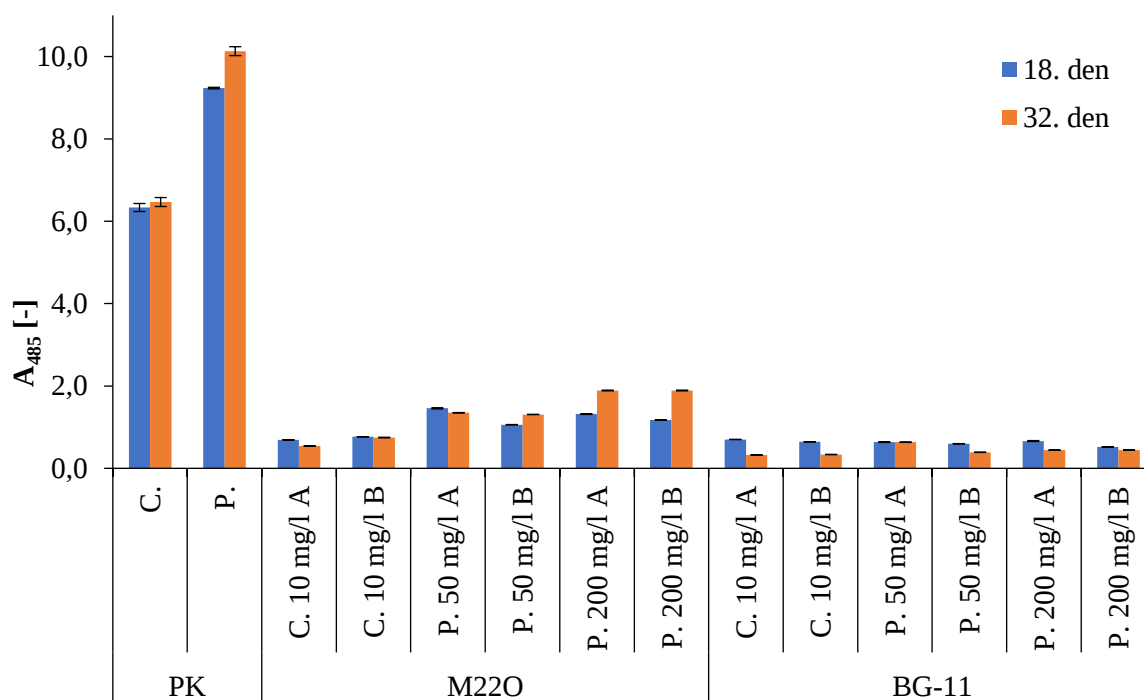
Obr. 15: Viabilita cyanobakteriálních kultur po 21 dnech kultivace

Pomocí techniky průtokové cytometrie, jejíž provedení je popsáno v kapitole 3.7, byla stanovena viabilita buněk cyanobakteriálních kontrol po 21 dnech kultivace. Na Obr. 15 můžeme vidět poměr živých a mrtvých buněk v jednotlivých kulturách. Důležitým zjištěním je, že přestože kultury nebyly vystaveny žádnému selekčnímu tlaku, nachází se zde, především u kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803, poměrně velké procento přirozeně mrtvých buněk, jejichž přítomnost byla způsobena stárnutím kultury a běžnou manipulací. Dosáhnout kultury o 100% zastoupení živých buněk je nemožné.

4.3 Adaptivní laboratorní evoluce využívající měď

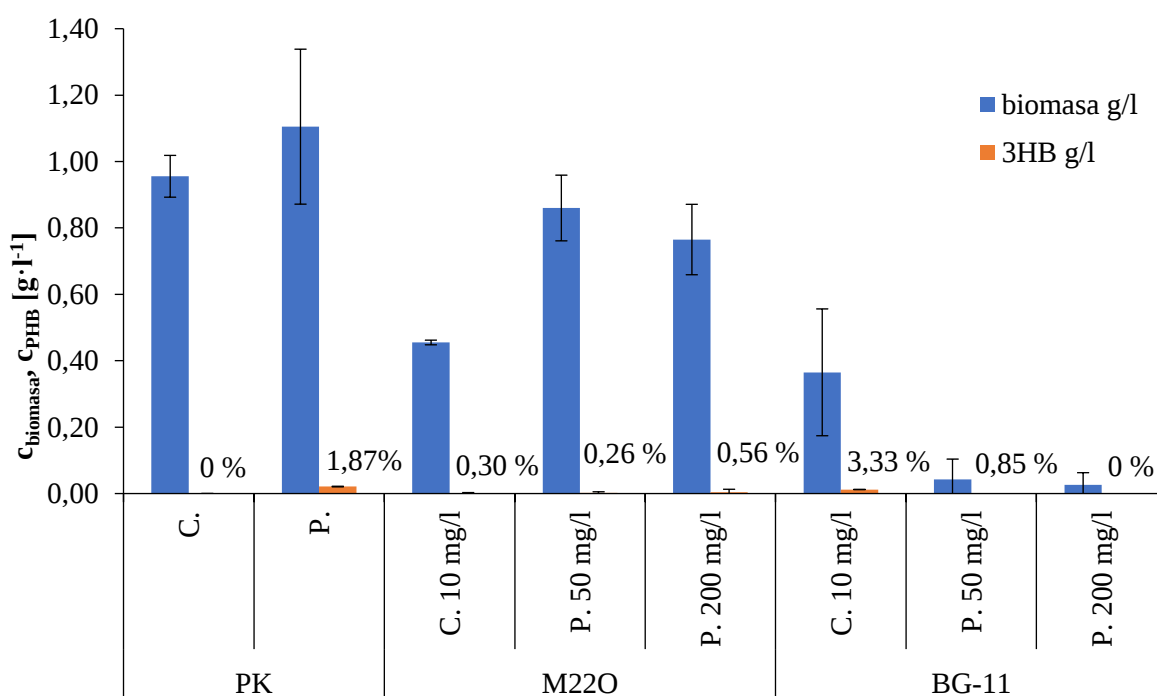
Druhým selekčním tlakem využívaným pro experimenty adaptivní laboratorní evoluce bylo vystavení cyanobakteriálních kultur prostředí obsahující Cu^{2+} o koncentracích 10 mg/l pro *Synechocystis salina* CCALA 192 a 50 a 200 mg/l pro *Synechocystis* sp. PCC 6803. Zvolení Cu^{2+} jako selekčního tlaku bylo podmíněno její běžnou přítomností v životním prostředí a síran měďnatý se zároveň, stejně jako peroxid vodíku, používá k odstranění toxických cyanobakterií ze sladkovodních nádrží. Mimo jiné existují i záznamy o schopnosti cyanobakterií tvořit Cu^{2+} rezistentní mutanty, kteří po procesu adaptace vykazují sníženou schopnost přežít v prostředí bez přítomnosti měďnatých kationtů [120]. Dalším důvodem ke zvolení síranu měďnatého jako stresového faktoru, byl náznak souvislosti mezi produkcí polyhydroxyalkanoátů v buňkách kmene *Cupriavidus necator* H16 a přítomností Cu^{2+} v prostředí [116].

V experimentu adaptivní laboratorní evoluce využívající měď byl zkoumán vliv Cu^{2+} na ukázkové cyanobakteriální kmeny ve dvou médiích o různých složeních. Postup přípravy kultur je popsán v kapitole 3.3.2.



Obr. 16: Hodnoty absorbancí cyanobakteriálních kultur po přidavcích Cu^{2+} o koncentracích 10, 50 a 200 mg/l. C. – *Synechocystis salina* CCALA 192, P. – *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Z výsledných hodnot absorbancí zobrazených na Obr. 16 můžeme vidět, že i když Cu^{2+} nemají tak velké inhibiční účinky na růst cyanobakteriálních kultur jako peroxid vodíku, nárůst biomasy je i přesto velice nízký. Jako naprosto nevhodné pro kultivaci s přítomností mědi se projevilo médium BG-11 v jehož prostředí nedocházelo k žádnému nárůstu biomasy, naopak biomasa s časem ubývala. Taktéž se jeví jako nevhodný pro adaptaci na měď kmen *Synechocystis salina* CCALA 192, jelikož u tohoto kmene nebyl pozorován nárůst biomasy, přestože média pro jeho kultivaci obsahovala nejmenší koncentrace Cu^{2+} . *Synechocystis* sp. PCC 6803 při kultivaci v médiu M22O oproti tomu snáší přítomnost mědi v médiu o něco lépe a je zde pozorován trend, kdy je nárůst biomasy vyšší u médií s větší koncentrací mědi. Vysvětlením může být silnější obranný mechanismus buněk než u menších koncentrací, které buňka zaznamená později a nezačne dostatečně reagovat.



Obr. 17: Stanovení množství biomasy a množství PHA po vystavení kultur 10, 50 a 200 mg/l Cu^{2+} . C. – *Synechocystis salina* CCALA 192, P. – *Synechocystis* sp. PCC 6803.

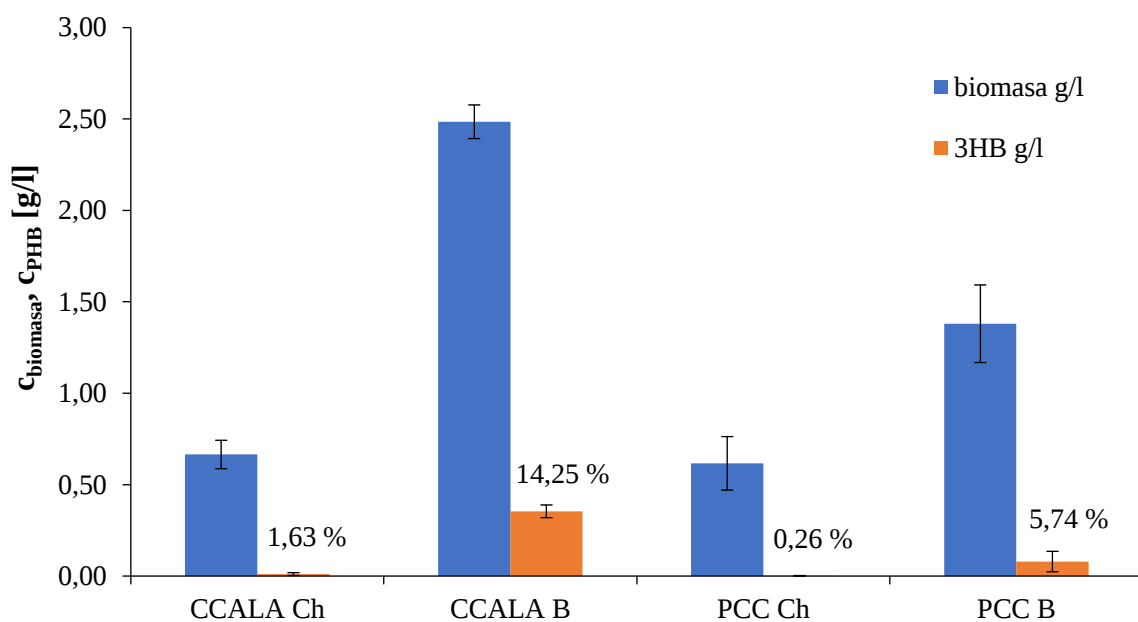
Gravimetrické vyhodnocení obsahu biomasy (Obr. 17) společně s vyhodnocením koncentrace PHA v buňkách přineslo překvapivé výsledky. Médium BG-11 se stejně jako u spektrofotometrického vyhodnocení jeví, co se nárůstu biomasy týče nevhodné, kdy *Synechocystis* sp. PCC 6803 má obsah biomasy naprosto minimální. Toto médium se však překvapivě zdá vhodné, jako produkční médium, kdy kmen *Synechocystis salina* CCALA 192, měl na BG-11 i přes nízký nárůst biomasy největší koncentraci PHA v sušině, a to 3,33 %. Stejným případem je i kmen *Synechocystis* sp. PCC 6803, který má sice v médiu M22O největší nárůst biomasy vůbec, a to 0,86 g/l, největší produkci PHA je však možné pozorovat v médiu BG-11, a to 0,85 %. Výsledky gravimetrického stanovení dále nepotvrdily, že by kultury obsahující větší koncentraci Cu^{2+} měly zároveň i větší množství biomasy, jako se zdálo u spektrofotometrického stanovení. Jednalo se tedy nejspíše o zkreslení výsledků vysokým zabarvením média způsobeným přítomností síranu měďnatého. Z výsledků se dále nijak

nepotvrdilo, že by přítomnost mědi v médiu ovlivňovala akumulaci PHA, jelikož největší koncentrace byla zaznamenána u kontroly *Synechocystis sp.* PCC 6803, na kterou nebyl vyvíjen žádný selekční tlak.

Z důvodu velice nízkého obsahu biomasy, který v médiu BG-11 s časem klesal, proběhlo po 32 dnech přeočkování pro podpoření nárůstu kultury do médií s koncentrací mědi 10 mg/l. Ani snížení koncentrace v médiu růst kultury nepodpořilo a adaptivní experiment za použití mědi jako stresového faktoru se nezdařil. Měď byla vyhodnocena jako velice silný inhibitor, na který by byla případná adaptace velice složitá, avšak podle studie *Shavyrina a kol. (2001)* provedené na kmenu *Synechocystis aquatilis* ne nemožná [121].

4.4 Působení akutních stresů na kultury o rozdílném obsahu PHA

Jak již bylo dříve popsáno, akumulace PHA granulí by měla pomoci mikroorganismům přežívat za nepříznivých podmínek [38]. Po nezdaření evolučních experimentů bylo u cyanobakteriálních kmenů *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 zkoumáno, zda přítomnost PHA v kultuře pomáhá buňkám přežít při vystavení akutnímu stresu a zda by tato informace mohla sloužit pro využití při adaptaci.



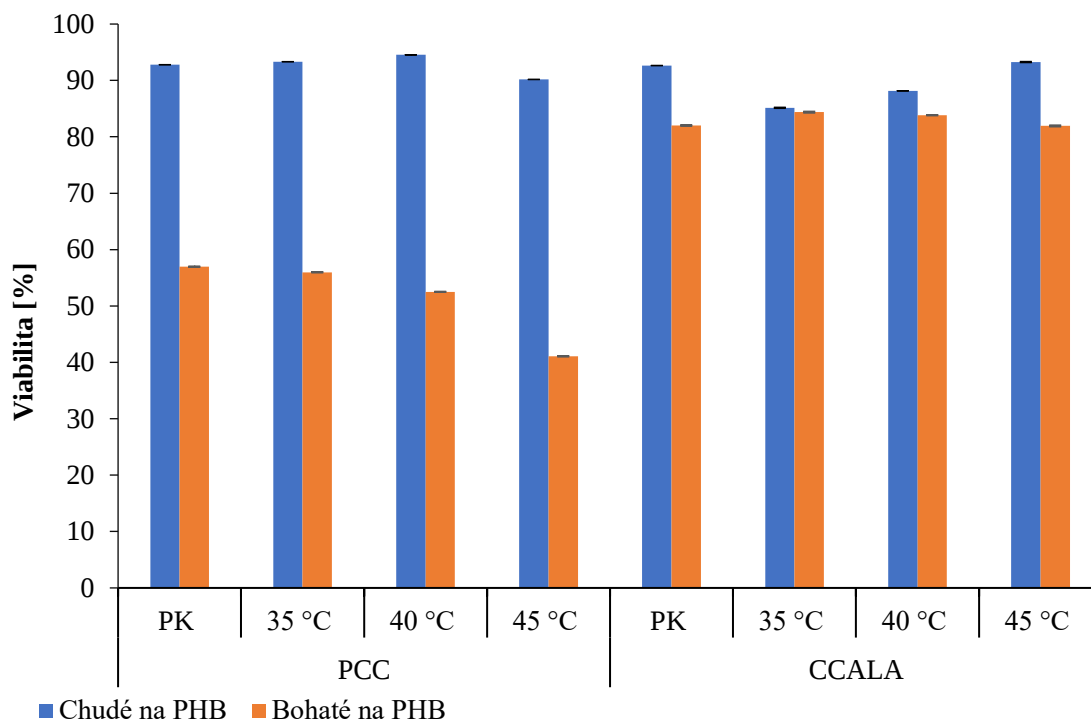
Obr. 18: Stanovení množství biomasy a PHA u kultur chudých (Ch) a bohatých (B) na polymer

V následujících experimentech akutního stresování byly použity cyanobakteriální kultury lišící se stářím a množstvím PHB. Objem biomasy v kultuře a koncentrace polyhydroxyalkanoátů testovaných kultur je zobrazena na Obr. 18.

4.4.1 Akutní teplotní stres

Výkyvy teplot jsou jedním z hlavních stresových faktorů působících na mikroorganismy jak v prostředích přirozeného výskytu, tak v prostředí laboratoří, nejsou-li kultivovány uvnitř inkubátorů. Kultivace cyanobakterií mimo stupeň jejich optimální teploty (30 °C) vede ke

zpomalení nárůstu biomasy a má vliv i na tvorbu lipidů [122]. V experimentu akutního teplotního stresu byly kultury testovaných kmenů lišící se obsahem PHB vystaveny teplotám přesahujícím optimální teplotu růstu po dobu 30 minut a následně proběhla analýzy viability buněk metodou průtokové cytometrie.



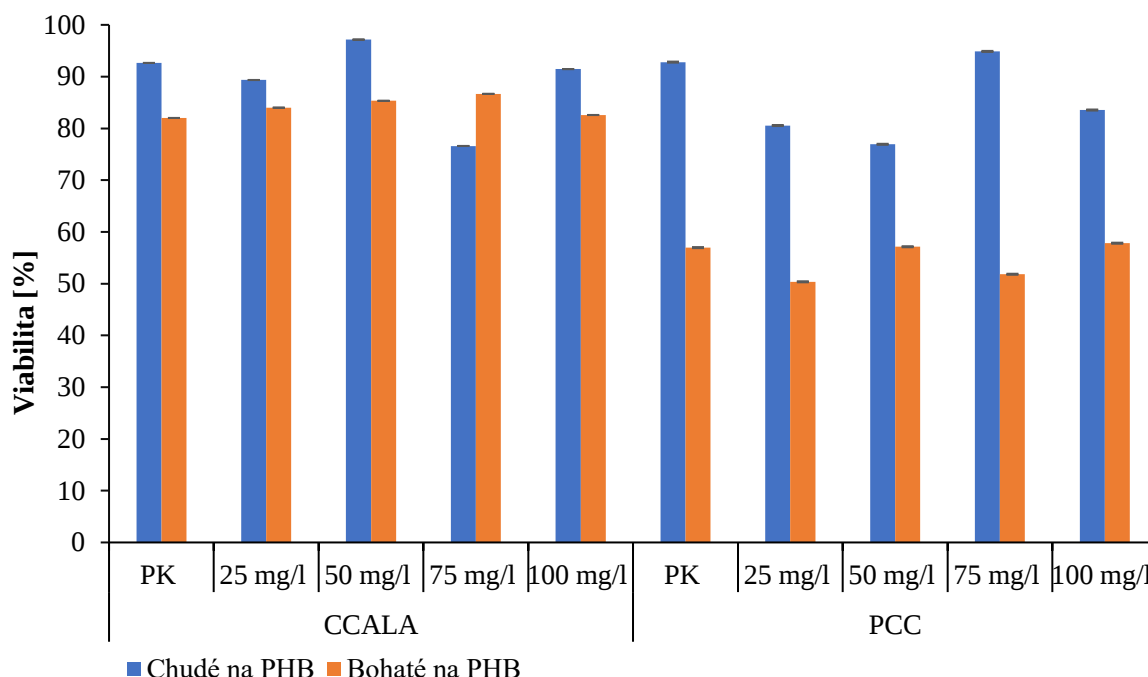
Obr. 19: Porovnání viability kultur bohatých a chudých na PHB po působení teplotního stresu

Na Obr. 19 můžeme pozorovat změny ve viabilitě buněk po působení teplotního stresu. Z výsledků je patrné, že námi zvolené teploty nebyly dostatečně vysoké pro ovlivnění životaschopnosti buněk po jejich vystavení tlaku po dobu 30 minut. Z dat zároveň můžeme určit, že není pravděpodobná závislost na množství PHB v buňce a schopnosti odolávat vyšším teplotám, jelikož jediný viditelnější pokles viability je právě u *Synechocystis sp.* PCC 6803 kultury bohaté na PHB vystavené teplotě 45 °C. U *Synechocystis sp.* PCC 6803 bohaté na PHB můžeme dále zaznamenat velké procento přirozeně mrtvých buněk již v nestresované kultuře způsobených právě stářím kultury. Pro lepší porovnání závislosti koncentrace PHB a vlivu vysoké teploty by bylo potřeba zvolit teploty alespoň nad 50 °C, nebo prodloužit dobu inkubace.

4.4.2 Akutní stres Cu^{2+}

Z dříve provedeného adaptivního experimentu (viz 4.3) máme informace o vysokých inhibičních vlastnostech Cu^{2+} pro cyanobakteriální kultury. Při akutním stresu bylo sledováno, zda nebude vyšší množství akumulovaného PHA pomáhat s resistencí proti Cu^{2+} , což by mohlo vést k úpravě evolučních experimentů, ve kterých by byl selekční tlak přidán až po dostatečném nárůstu kultury. Pro první experiment působení akutního stresu byly kultury vystaveny Cu^{2+}

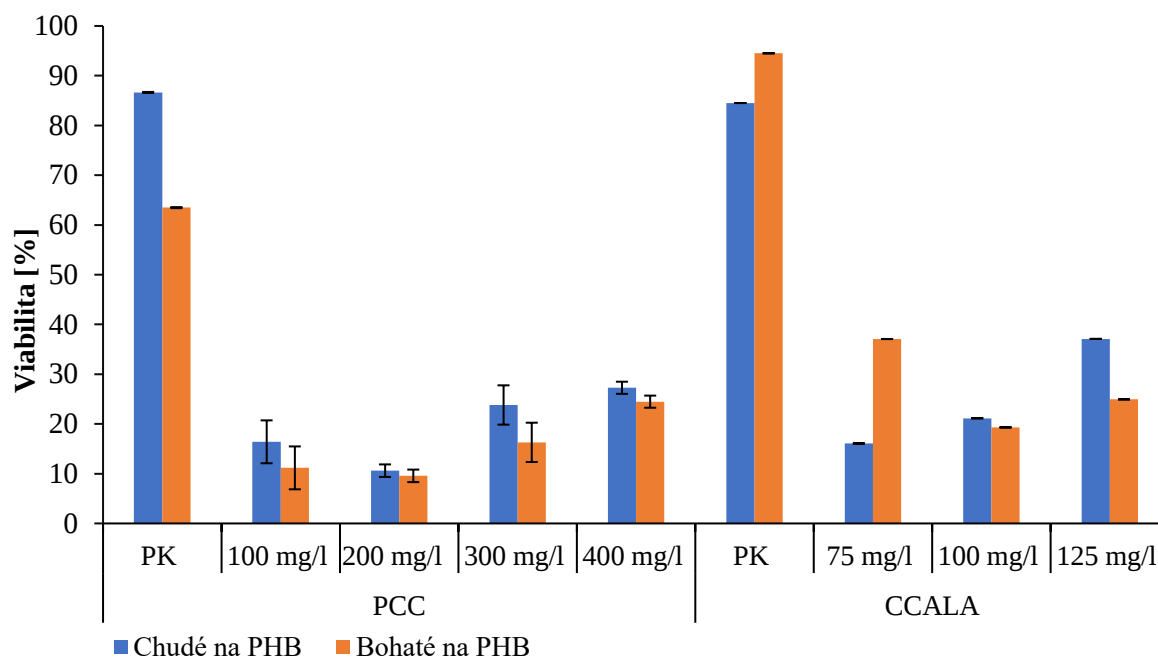
o koncentraci 25, 50, 75 a 100 mg/l po dobu jedné hodiny. Následně proběhlo stanovení viability buněk metodou průtokové cytometrie.



Obr. 20: Pozorování viability kultur bohatých a chudých na PHA po expozici 25, 50, 75 a 100 mg/l mědi po dobu 1 hodiny

Ze stanovení viability kultur pomocí průtokové cytometrie jejíž výsledky jsou zobrazené na Obr. 20 vyplývá, že působení stresu Cu^{2+} o zvolených koncentracích nemá na viabilitu buněk velký vliv. Největší úbytek živých buněk byl pozorován u *Synechocystis salina* CCALA 192 chudé na PHB při koncentraci mědi 75 mg/l a u *Synechocystis sp.* PCC 6803 chudé na PHB při koncentraci mědi 50 mg/l. V obou případech byl pokles viability oproti pozitivní kontrole o 16 %. Úbytek buněk ve vzorcích nemusel být způsoben přítomností Cu^{2+} , jelikož při vystavení vyšším koncentracím nebyl pozorován pokles ve viabilitě. Dále nebylo pozorováno, že by větší množství akumulovaného PHB napomáhalo cyanobakteriím lépe odolávat stresu způsobenému přítomností kationtů Cu^{2+} .

Vzhledem k dlouhé kultivační době cyanobakterií bylo možné, že působení stresu po dobu pouze 60 minut není nedostatečné. Byl proto proveden experiment, kdy proběhlo vystavení buněk stresovému faktoru po dobu 24 hodin. Zvolené koncentrace mědi odpovídaly 100, 200, 300 a 400 mg/l pro *Synechocystis sp.* PCC 6803 a 75, 100 a 125 mg/l pro *Synechocystis salina* CCALA 192. Příprava experimentu je popsána v kapitole 3.4.3.

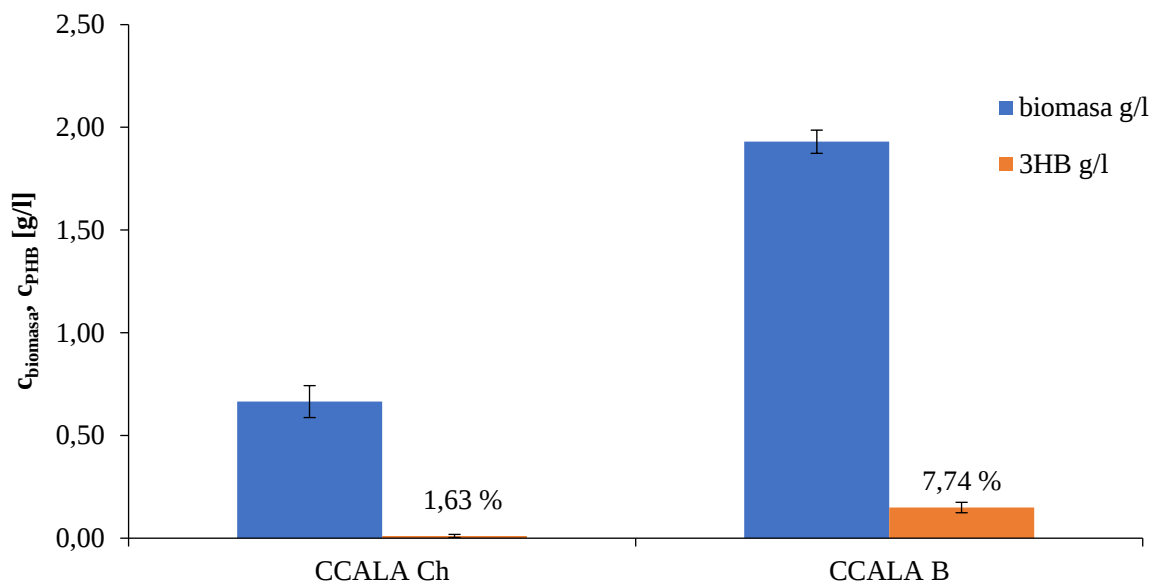


Obr. 21: Pozorování viability buněk kultur bohatých a chudých na PHA po expozici mědi po dobu 24 hodin

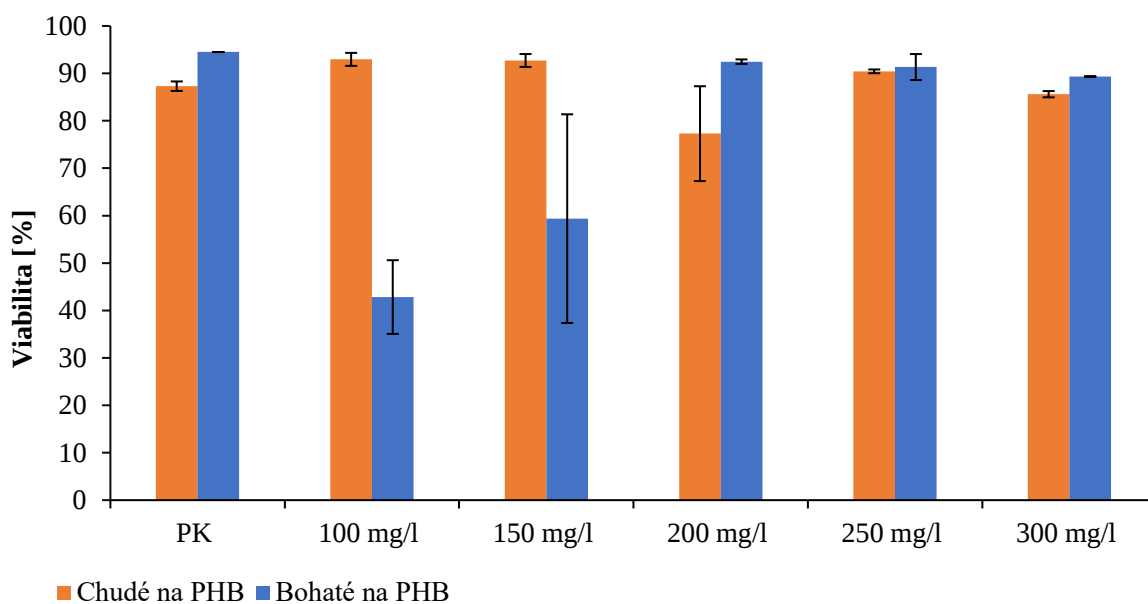
Na Obr. 21 zobrazujícím viabilitu buněk vystavených stresu mědi po dobu 24 hodin je patný markantní úbytek živých buněk. Naše hypotéza, že pro pozorování toxického působení Cu^{2+} je potřeba delší časový interval se tímto potvrdila. U kmene *Synechocystis sp.* PCC 6803 byl největší pokles živých buněk zaznamenán při koncentraci 200 mg/l, a to o 76 % u kultur chudých na PHB a 54 % u kultur bohatých na PHB. Při porovnání kultur o různém obsahu PHB po expozici stresu nebyl vidět žádný markantní rozdíl. Můžeme tedy říci, že PHB cyanobakteriím v tomto případě nepomáhal k lepšímu zvládnutí působícího tlaku.

U kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 byl největší úbytek viability pro kultury chudé na PHB pozorován při 75 mg/l, a to o 68 % a u kultury bohaté na PHB při 100 mg/l činil úbytek 76 %. Při koncentraci 75 mg/l se však zdá, že kultura bohatá na PHB zvládala tuto hladinu stresu lépe a přítomnost PHB tedy mohla napomáhat k přečkání stresových podmínek, u dalších koncentrací však tato spojitost pozorována nebyla. Jako již dříve v této práci u adaptivního experimentu je možné zaznamenat trend, kdy buňky zvládají lépe vyšší koncentrace stresu než koncentrace nižší. Cyanobakterie mají tedy pravděpodobně určitou hladinu toxicity po jejímž překročení dokáže buňka obrannými mechanismy zvládat stres lépe než při koncentracích nižších, kdy nedochází k adekvátní obranné reakci, nebo k včasnému zaznamenání přítomnosti toxické látky.

Pro bližší prozkoumání zvýšené rezistence u vyšších koncentrací mědi při akutním stresu byl proveden experiment s kmenem *Synechocystis salina* CCALA 192, u kterého byl tento trend více zřetelný v předchozím měření. Kultury chudé a bohaté na PHB byly vystaveny koncentracím mědi o hodnotách 100, 150, 200, 250 a 300 mg/l po dobu 1 hodiny. Poté byla pozorována viabilita buněk.



Obr. 22: Stanovení množství biomasy a PHA u kultur kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 bohatých a chudých na polymer



Obr. 23: Pozorování viability buněk kultur bohatých a chudých na PHA u kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 po expozici mědi

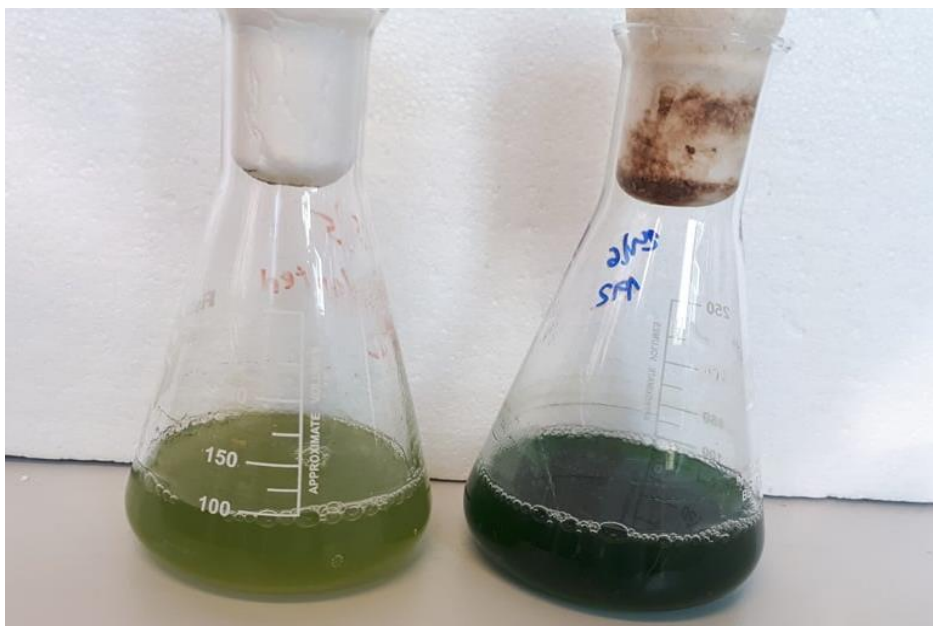
Z důvodu vyvzorkování původních kultur byly pro tento experiment použity kultury nové, obsah biomasy a koncentrace PHA jsou zobrazeny na Obr. 22. Z výsledků viability buněk viditelných na Obr. 23 můžeme určit, že u kultur bohatých na PHB opravdu roste rezistence s rostoucí koncentrací stresoru. Výsledky se však neshodují s předchozím experimentem, kde bylo zaznamenáno kolísání viability u kultur chudých na PHB. S jistotou se tedy nedá určit, zda opravdu existuje toxická hranice pohybující se okolo 100 mg/l mědi a stejně tak nebylo prokázáno, že by přítomnost PHA v buňce napomáhala zvýšit rezistenci.

4.5 Charakterizace kmenů adaptovaných na 6% NaCl

Z důvodu nezdařeného vytvoření vlastních adaptovaných kmenů byly pro zkoumání vlivu adaptace na vlastnosti buněk použity kultury poskytnuty Universität für Bodenkultur – BOKU adaptované na roztok 6 % NaCl. V následujících experimentech byly srovnávány vlastnosti a rezistence kultur adaptovaných a kultur bez adaptace. Adaptace na NaCl se ukázala pro cyanobakterie velice vhodná a snadná, kdy k vytvoření buněk adaptovaných na 6 % NaCl může dojít již během šesti týdnů.

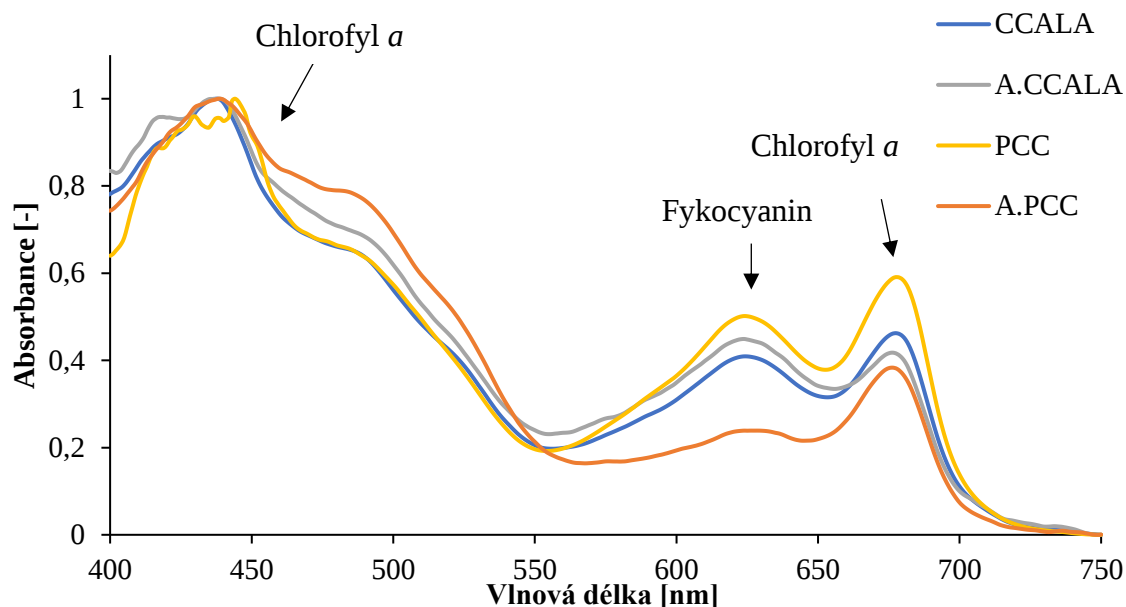
4.5.1 Změny obsahu cyanobakteriálních barviv

Po dostatečném nárůstu adaptovaných a neadaptovaných kultur bylo jako první provedeno jejich vizuální porovnání. Především bylo porovnáváno zbarvení a sytost jednotlivých kultur.



Obr. 24: Vizuální porovnání adaptované kultury, kultivované v 6% NaCl (vlevo) a neadaptované kultury, kultivované v čistém médiu (vpravo), kmene *Synechocystis salina* CCALA 192

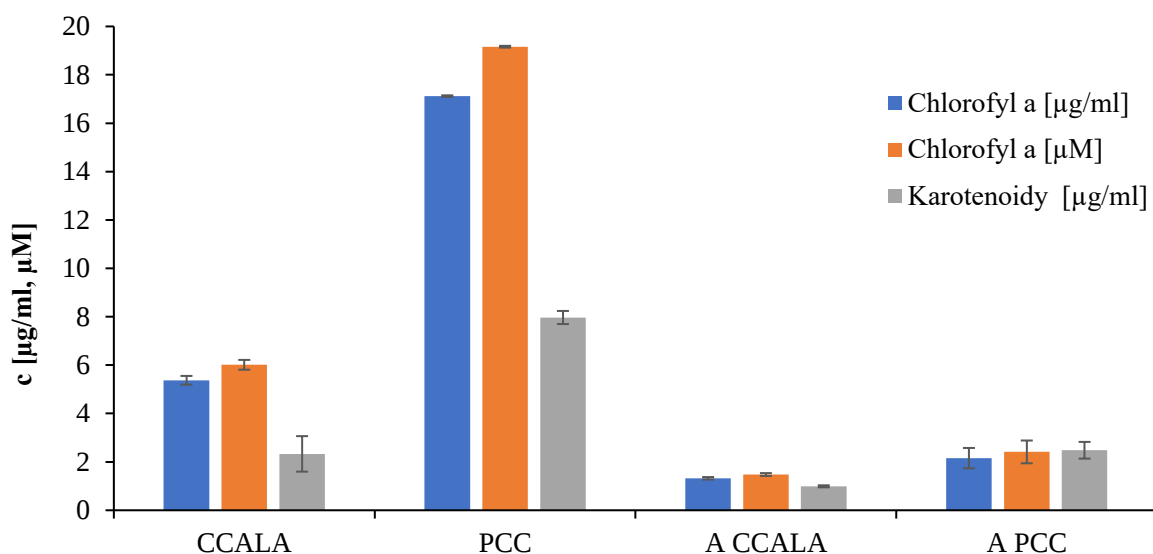
Již při vizuálním porovnání viditelném na Obr. 23 je patrný rozdíl mezi adaptovanou a neadaptovanou kulturou. Adaptovaná kultura měla o poznání světlejší a méně sytou barvu ukazující, že změny spojené s adaptací ovlivnily tvorbu cyanobakteriálních barviv. Adaptované kmeny se tedy budou pravděpodobně lišit morfologií a menší přítomnost pigmentů ukazuje na efektivnější využívání světelné energie pro fotosyntézu [123]. Zároveň je možné, že na rozdíl v sytosti zbarvení nemá vliv menší přítomnost cyanobakteriálních barviv v buňce, ale menší nárůst biomasy za daný čas jako takové, což by ukazovalo sníženou schopnost růstu adaptovaných kultur. Kromě změny zbarvení nebyly pozorovány žádné větší rozdíly, jako je tvorba filmů a usazenin. Pro lepší identifikaci přítomných barviv byly kultury zkoumány metodou UV-VIS spektroskopie.



Obr. 25: UV-VIS spektrum adaptovaných a neadaptovaných kultur

V UV-VIS spektru adaptovaných a neadaptovaných kultur viditelném na Obr. 25 je možné pozorovat rozdíl v podílu fotosyntetických barviv. U adaptovaných kultur kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803 je zaznamenán snížený obsah jak chlorofylu *a*, tak fykocyaninu. U kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 nebyl zaznamenán příliš velký rozdíl v obsahu cyanobakteriálních barviv mezi adaptovanými a neadaptovanými kulturami.

Pro bližší stanovení obsahu fotosyntetických barviv a karotenoidů byla provedena extrakce pigmentů a následný výpočet koncentrace chlorofylu *a* podle rovnice (1) a (2) a koncentrace karotenoidů podle rovnice (3).

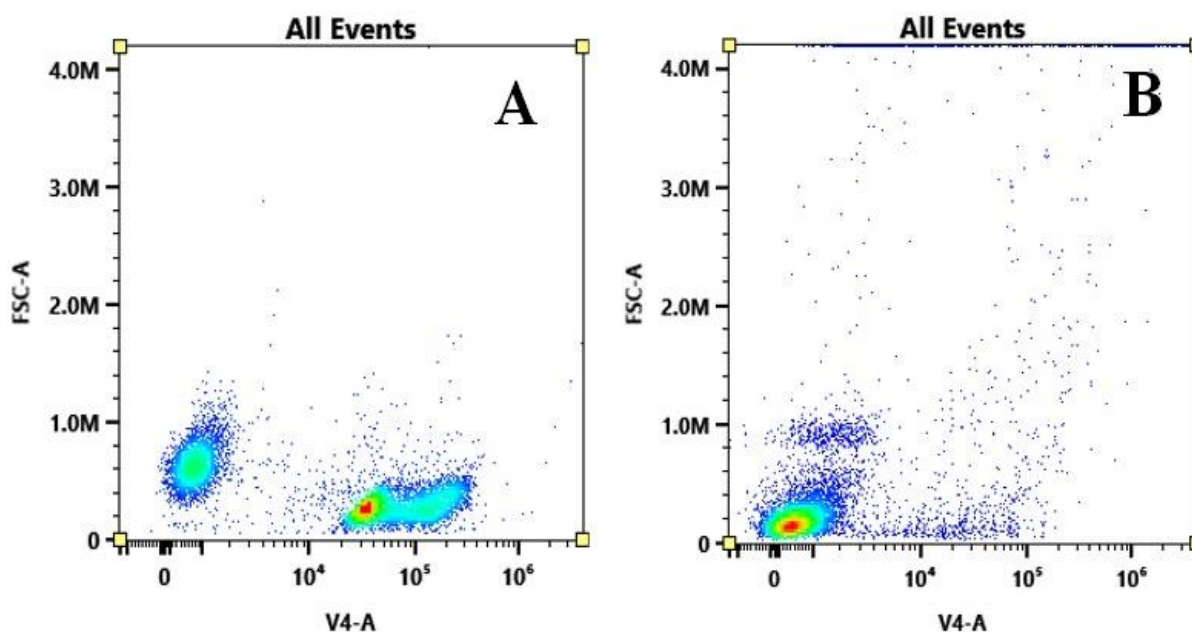


Obr. 26: Výsledné koncentrace cyanobakteriálních barviv v kulturách adaptovaných na 6% NaCl a v kulturách bez adaptace

Na Obr. 26 můžeme pozorovat rozdíl v koncentracích cyanobakteriálních barviv v kulturách adaptovaných na 6 % NaCl a kulturách neadaptovaných. Jak již bylo dříve vizuálně a metodou UV-VIS učeno, adaptované kmeny mají nižší obsah těchto barviv. U neadaptovaného kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 byla koncentrace chlorofylu *a* stanovena na 5,37 µg/ml a koncentrace karotenoidů na 2,33 µg/ml, zatímco u kmene adaptovaného byla koncentrace chlorofylu *a* vypočtena na 1,32 µg/ml a koncentrace karotenoidů na 1,03 µg/ml. U kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803 byl rozdíl ještě mnohem markantnější, kdy koncentrace chlorofylu *a* u neadaptované kultury byla téměř 10x větší než u kultury adaptované, konkrétně 19,16 µg/ml u neadaptované oproti 2,4 µg/ml u adaptované. Stejně tak obsahovaly adaptované buňky menší podíl karotenoidů.

4.5.2 Morfologie buněk

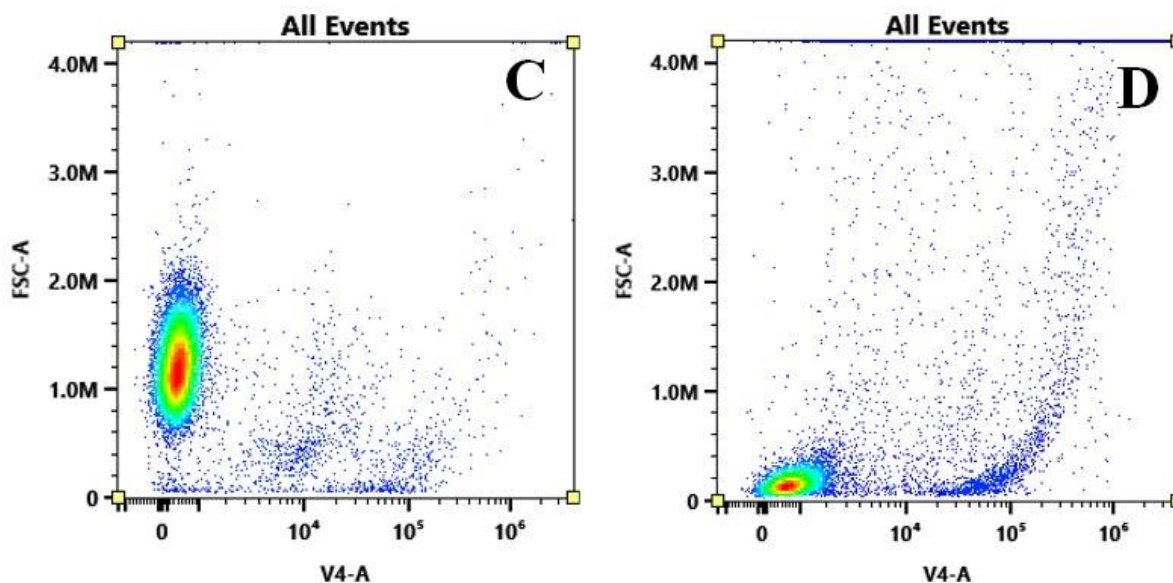
Pomocí metody průtokové cytometrie bylo zkoumáno, zda kultury vzniklé adaptací na NaCl vykazují oproti neadaptovaným kulturám morfologické odlišnosti, co se týče velikosti cyanobakteriálních buněk. Je známo, že zmenšení buněčné velikosti při působení vysoké koncentrace solí často doprovází proces adaptace. Buňka tímto krokem zmenší povrch, na který stresový faktor působí a lépe se tak s nepříznivým prostředím vyrovnává [123].



Obr. 27: Cytogramy adaptované a neadaptované kultury *Synechocystis salina* CCALA 192
A – neadaptovaná, B – adaptovaná

Na Obr. 27 můžeme vidět výsledné cytogramy z průtokové cytometrie pro adaptovanou a neadaptovanou kulturu kmene *Synechocystis salina* CCALA 192. V cytogramu je možné sledovat intenzitu fluorescence na vodorovné ose, udávající informace o viabilitě buněk, a přímý rozptyl (FSC) na ose svislé. Právě informace na svislé ose nám udávají velikost buňky. Z cytogramů můžeme vidět rozdílné hodnoty při srovnání adaptovaných a neadaptovaných

kultur. Jak se předpokládalo u adaptovaných kultur je možné pozorovat zmenšení velikosti buněk, což napomáhá k přežití v prostředí obsahujícím NaCl.

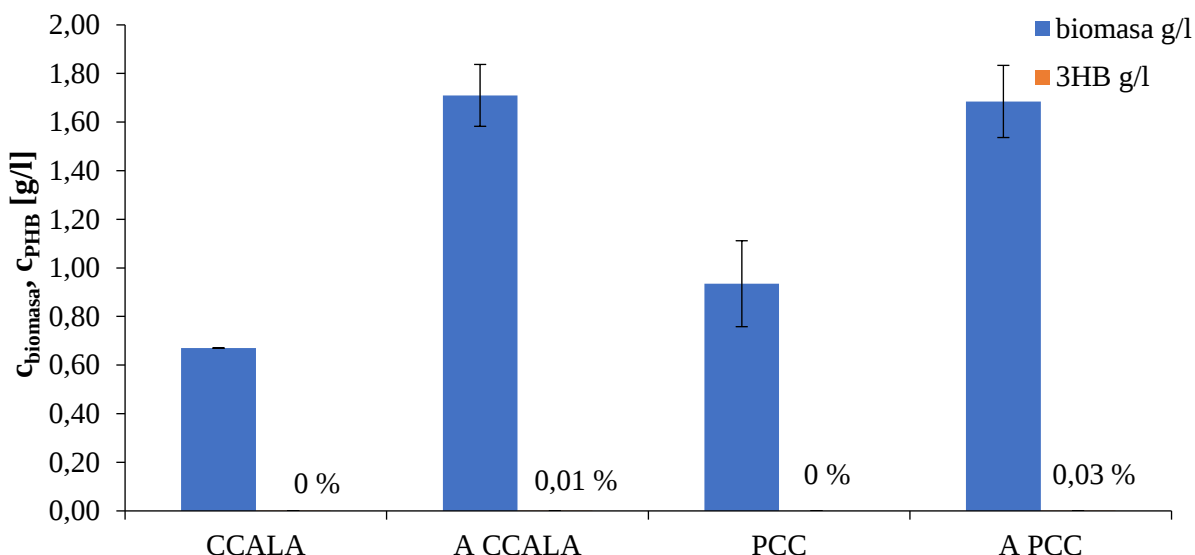


Obr. 28: Cytogramy adaptované a neadaptované kultury *Synechocystis* sp. PCC 6803 C – neadaptovaná, D – adaptovaná

Cytogramy zaznamenané na Obr. 28 poskytují informace o adaptovaných a neadaptovaných kulturách *Synechocystis* sp. PCC 6803. Stejně jako u kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 je zde pozorováno zmenšení adaptovaných buněk oproti neadaptovaným. Při srovnání původních neadaptovaných kmenů si také můžeme povšimnout, že kmen *Synechocystis salina* CCALA 192 má přirozeně buňky menší, než PCC 6803. Jak bylo dříve popsáno v kapitole 2.1.4.2 jedná se o zástupce žijícího v mořské vodě, který je tedy schopný přirozeně snášet vyšší koncentrace soli. Je tedy možné předpokládat, že většina halofilních zástupců přizpůsobených k přežití ve slaném prostředí má menší velikosti buněk, než je tomu u zástupců sladkovodních.

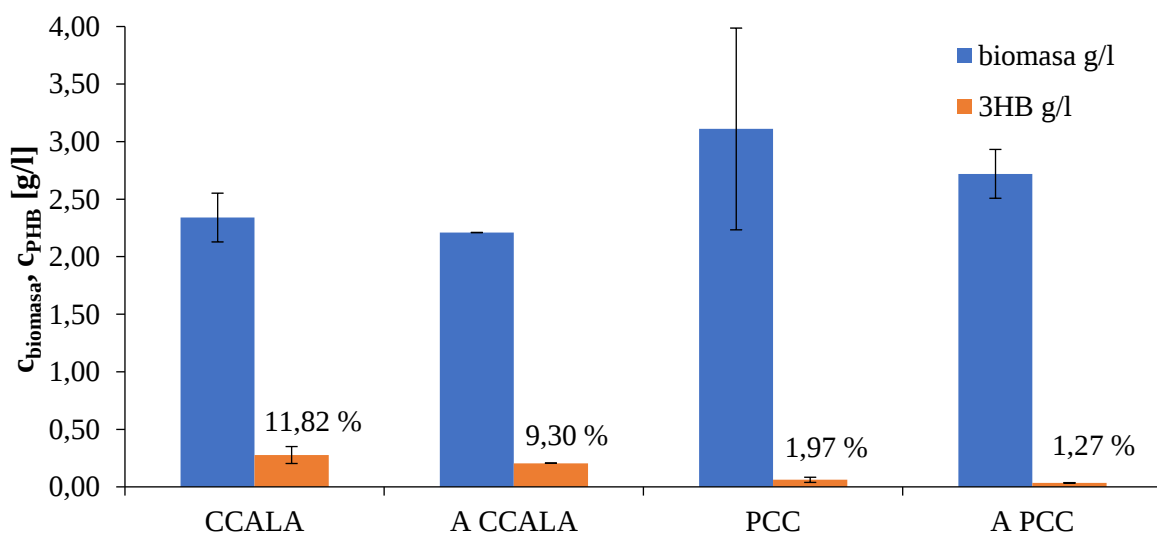
4.5.3 Obsah biomasy a PHA

Dalším porovnávaným parametrem mezi adaptovanými a neadaptovanými buňkami byl obsah biomasy a koncentrace PHA. Bylo pozorováno, zda má adaptace vliv na rychlost růstu kultury, jelikož jedním z důvodů nízké koncentrace barviv a vizuálního rozdílu mohla být pomalejší rychlost nárůstu. Dále byla metodou plynové chromatografie stanovena a porovnána koncentrace akumulovaného PHA, kdy bylo zkoumáno, zda adaptace akumulaci podporuje a jestli PHA napomáhá přežít v prostředí bohatém na sůl. Je známo, že samotná přítomnost NaCl v médiu vede k navýšení aktivity enzymu 3-ketothiolázy podílejícím se na biosyntéze PHA [124]. Předpokládá se tedy, že by enzymatické změny během adaptace mohly vést k lepší akumulaci polymeru.



Obr. 29: Stanovení obsahu biomasy a PHA adaptovaných a neadaptovaných kultur kmenů *Synechocystis* sp. 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 po 14 dnech kultivace

Na Obr. 29 je možné vidět rozdíl v obsahu biomasy a PHA mezi adaptovanými a neadaptovanými kulturami. Ukázalo se, že adaptované kultury obsahují mnohem více biomasy, přestože, jak bylo dříve zmíněno, mají menší koncentraci cyanobakteriálních barviv. Největší obsah biomasy byl naměřen u adaptované kultury kmene *Synechocystis salina* CCALA 192, a to 1,71 g/l. U stejného kmene neadaptované kultury byl zároveň naměřen nejmenší obsah biomasy 0,67 g/l, což naznačuje, že adaptace zefektivnila schopnost růstu téměř trojnásobně. Koncentrace PHA je u všech měřených kultur malá, jelikož se jednalo o mladé kultury v druhém týdnu kultivace. I přes nízkou akumulaci můžeme vidět, že adaptace pomohla i v tomto směru. U obou adaptovaných kultur byla detekována přítomnost PHA, kdežto u kultur neadaptovaných byl obsah polymeru mimo detekční limity. Největší produkci PHA vykazovala adaptovaná kultura kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803, a to 0,03 %.



Obr. 30: Stanovení obsahu biomasy a PHA adaptovaných a neadaptovaných kultur kmenů *Synechocystis* sp. 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192 po 40 dnech kultivace

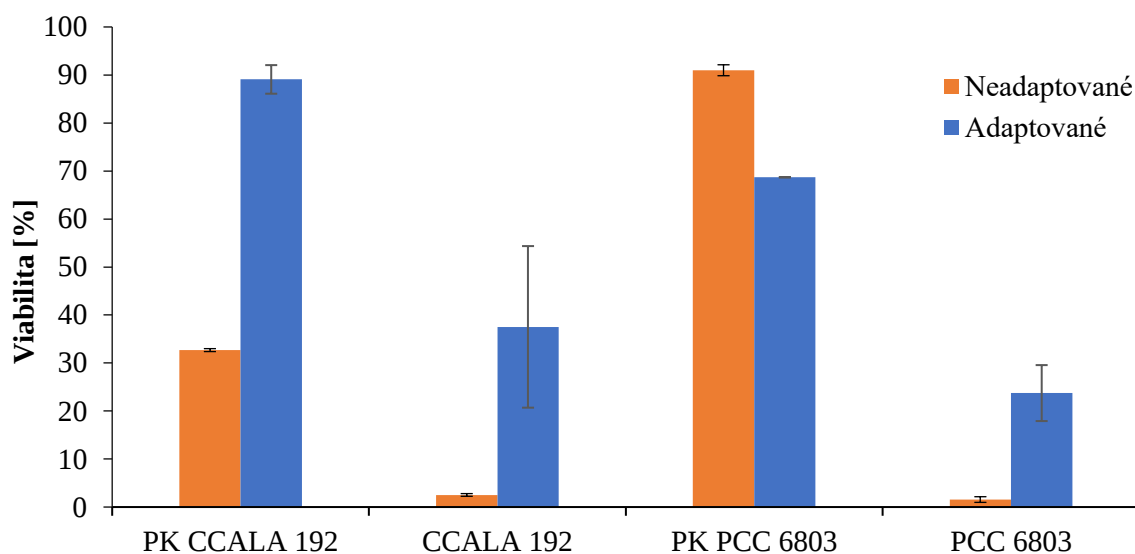
Pro lepší stanovení vlivu adaptace na akumulaci PHA byly analyzovány také kultury bohaté na polymer po 40 dnech kultivace, jejichž vyhodnocení je možné vidět na Obr. 30. V tomto případě se nepotvrdilo, že by adaptace měla na akumulaci PHA pozitivní vliv, jelikož větší množství polymeru bylo detekováno u obou neadaptovaných kultur. Největší koncentrace PHA byla zaznamenána u kmene *Synechocystis salina* CCALA 192 neadaptované kultury, kdy množství PHB činilo 11,82 %. Také největší množství biomasy bylo zaznamenáno u neadaptované kultury tentokrát kmene *Synechocystis* sp. PCC 6803 kdy biomasa činila 3,11 g/l, čímž se vyvrátil i předpoklad, že adaptace pomáhá pro bohatší nárůst biomasy. Adaptované buňky tedy vykazují vyšší nárůst a produkci na počátku kultivace, s přibývajícím časem však svou výhodu ztrácí a neadaptované kultury je svým nárůstem a produkcí předčí.

4.5.4 Rezistence proti akutnímu stresu

Stejně jako v kapitole 4.4, kde byl zkoumán efekt akutních stresů na kultury o rozdílném obsahu akumulovaného PHA, byl v tomto experimentu zkoumán vliv akutních stresů na kmeny adaptované na 6 % NaCl. Při vystavení cyanobakteriální buňky vysoké koncentraci solí začnou probíhat obranné reakce, jako je změna složení membrány a tvorba osmolytů. Osmolyty jsou nízkomolekulární, hydrofilní, netoxické molekuly, často oligosacharidy (např. trehalóza), ale také trimethylglycin, nebo glukosylglycerol, které pomáhají stabilizovat koncentraci vnitřních látek pod osmotickým stresem [125]. Veškeré tyto změny společně s efektivnější akumulací PHA mohou napomáhat k lepší rezistenci vůči dalším selekčním tlakům v prostředí.

4.5.4.1 Oxidační stres peroxidem vodíku

V dřívějších experimentech působení peroxidu vodíku na cyanobakteriální buňky bylo zjištěno, že se jedná o velice silný inhibitor růstu, v jehož přítomnosti nejsou kultury schopny přežít. Bylo zkoumáno, zda buněčné změny způsobené adaptací na NaCl pomáhají zvýšit rezistenci také vůči oxidačnímu stresu způsobenému přítomností H_2O_2 v médiu. V experimentu se postupovalo podle kapitoly 3.4.6 a poté proběhlo vyhodnocení viability buněk metodou průtokové cytometrie.

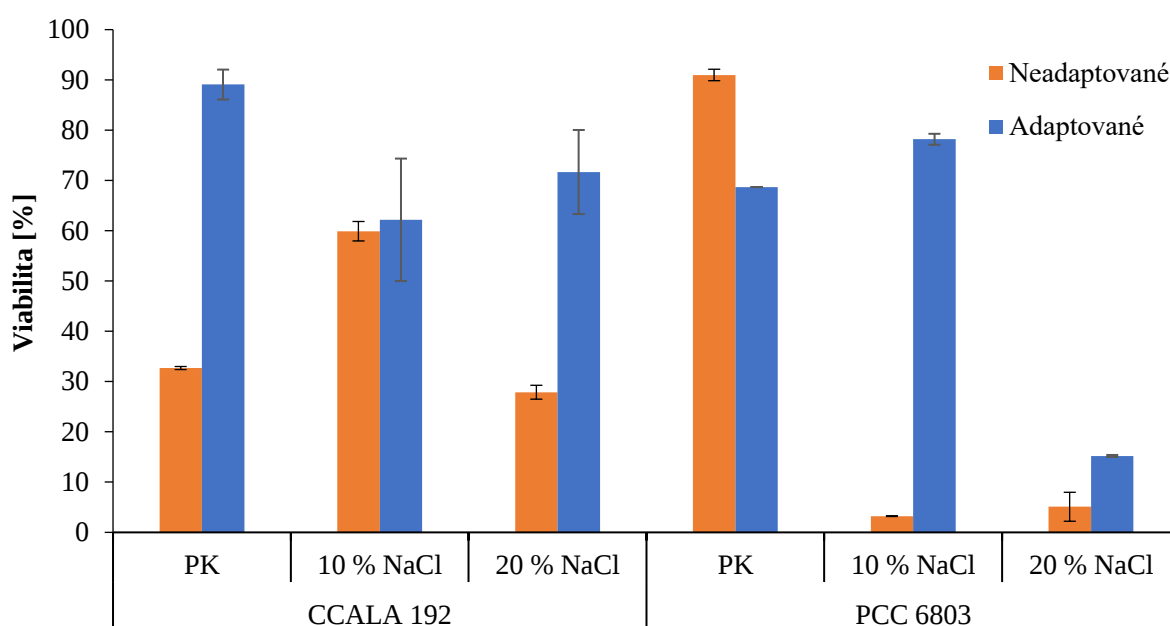


Obr. 31: Viabilita adaptovaných a neadaptovaných buněk po vystavení stresu peroxidem vodíku

Ze zaznamenané viability adaptovaných a neadaptovaných buněk po vystavení 10% H₂O₂ (Obr. 31) je možné konstatovat, že adaptace pomohla ke zvýšení rezistence proti oxidačnímu stresu. U neadaptovaných buněk je možné pozorovat úhyn až o 90 %, zatímco u buněk adaptovaných pouze o 52 %. K větší rezistenci mohly přispět změny ve struktuře membrány, nebo větší efektivita fotosyntetického systému II (PSII), který odbourává volné radikály a brání buňku před oxidačním stresem. Dále je možné si povšimnout, že neadaptovaná kultura *Synechocystis salina* CCALA 192 obsahovala velké množství mrtvých buněk i v pozitivní kontrole bez vystavení stresu, kdy došlo pravděpodobně k velkému úhynu během procesu kultivace.

4.5.4.2 Osmotický stres chloridem sodným

V tomto experimentu bylo posouzeno, zda adaptované cyanobakterie dokážou lépe snášet hypertonické prostředí, nebo jestli náhlá vysoká koncentrace soli bude vyvíjet příliš velký osmotický stres na adaptaci pozměněnou morfologii a buňka nepřežije. Cyanobakterie byly v tomto testování vystaveny prostředí s 10 a 20 % obj. NaCl po dobu 2 hodin. Následně bylo provedeno porovnání viability pomocí průtokové cytometrie.



Obr. 32: Viability adaptovaných a neadaptovaných buněk po vystavení stresu chloridem sodným

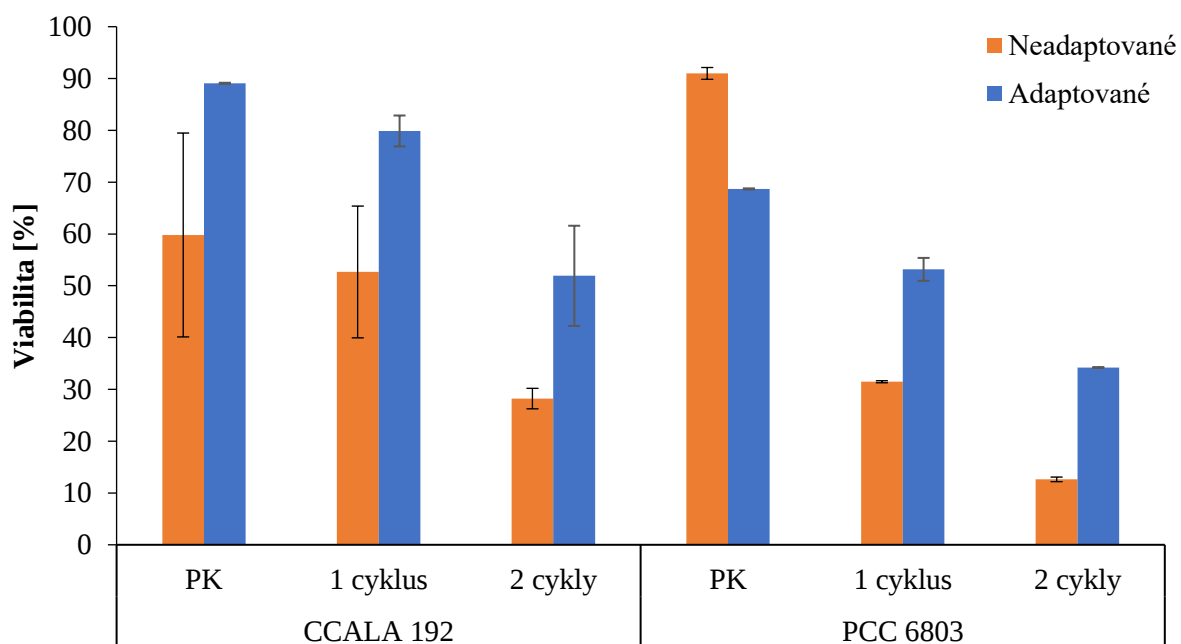
Na Obr. 32 můžeme vidět vliv vysoké koncentrace NaCl na kultury adaptovaných a neadaptovaných cyanobakteriálních kmenů. U působení NaCl na kmen *Synechocystis salina* CCALA 192 je možné pozorovat, že 10 % NaCl dobře snáší jak kultura neadaptovaná, tak kultura adaptovaná. Bohužel je zde u neadaptovaného kmene nesrovnalost mezi vzorkem a pozitivní kontrolou, kdy pozitivní kontrola vykazovala menší viabilitu, než vzorek samotný. To mohlo být způsobeno nepřesným nabráním vzorku přístrojem, nebo neúmyslným poškozením pozitivní kontroly během přípravy měření. U vzorků s 20 % NaCl už můžeme vidět, že změny v buňce způsobené adaptací výrazně pomáhají vypořádat se s vysokým

osmotickým tlakem, *Synechocystis salina* CCALA 192 však jako zástupce mořských sinic vykazuje přirozeně vyšší stupeň rezistence vůči hypertonickému prostředí.

Z výsledků pro kmen *Synechocystis* sp. PCC 6803 je patrné, že pro šanci na přežití v prostředí s vyšší koncentrací solí je adaptace nutná. Neadaptovaná kultura vykazovala velmi malou viabilitu již při 10 % obj. NaCl, kde adaptovaná kultura neměla s přežitím problém. Při 20 % NaCl byl však pozorován velký úbytek viability také u kultury adaptované. V případech obou kmenů tedy adaptované kultury snášely osmotický stres lépe než buňky bez adaptace.

4.5.4.3 Stres mrazem

Osmolyty produkované v buňkách při osmotickém stresu mohou sloužit kromě ochrany před vysokým obsahem solí i jako kryoprotektanty chránící buňky přes působení mrazu. Hlavním osmoprotektantem produkovaným cyanobakteriemi, který zároveň slouží jako kryoprotektant je trimethylglycin. Přítomnost trimethylglycinu při působení mrazu chrání před agregací buněčný proteinů a pomáhá udržovat tekutost membrány [126]. Bylo pozorováno, zda adaptace na sůl a zvýšená produkce osmolytů pomáhá buňkám lépe odolat při opakovaném působení mrazu. V experimentu byla porovnávána viabilita adaptovaných a neadaptovaných buněk po vystavení mrazu v 1 a 2 cyklech. Příprava vzorků proběhla podle postupu v kapitole 3.4.2., následována detekcí pomocí průtokové cytometrie.



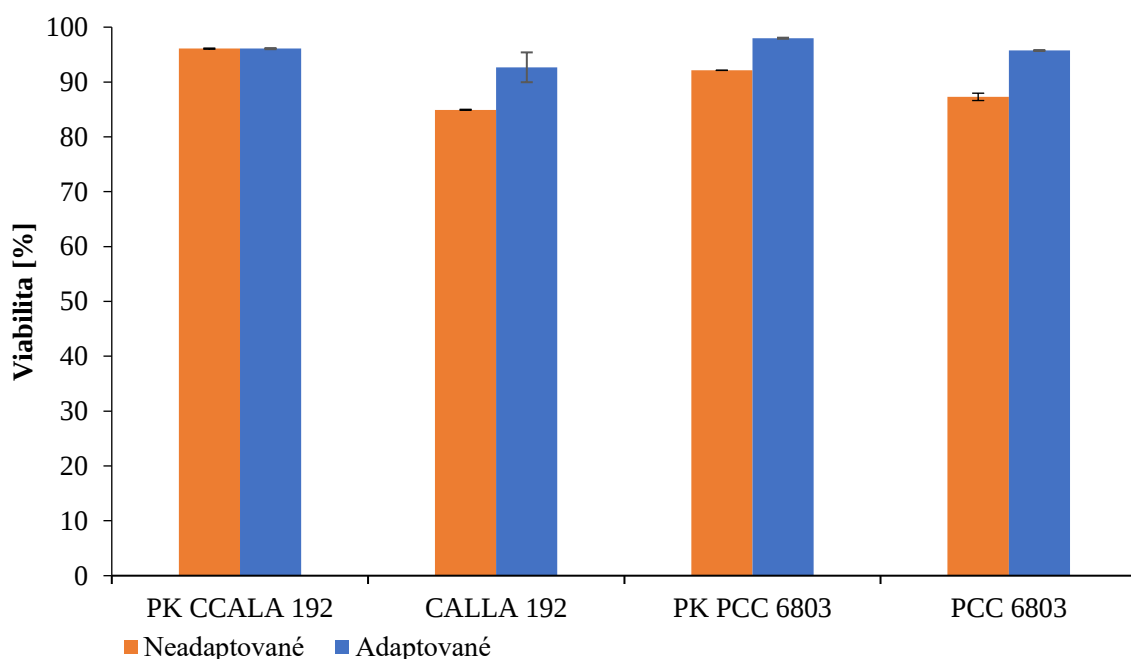
Obr. 33: Viabilita adaptovaných a neadaptovaných buněk po vystavení procesu mražení v 1 a 2 cyklech

Na Obr. 33 můžeme pozorovat záznam vability buněk po vystavení procesům mražení a rozmrazování. U obou kmenů byla zaznamenána vyšší viabilita v adaptovaných kulturách. Přítomné osmolyty vyvolané adaptací a změny v morfologii buněk chrání jedince před poškozením během mrazu. Vyšší rezistence proti mrazu byla opět pozorována u kmene

Synechocystis salina CCALA 192, což mohlo být způsobeno přítomností osmolytů již před adaptací. Kmen *Synechocystis* sp. PCC 6803 zvládá působení stresu mnohem hůře, kde docházelo k velké ztrátě viability už po prvním cyklu mrazení. U toho kmene lze lépe zaznamenat důležitost přítomnosti osmolytů při vystavení nízkým teplotám.

4.5.4.4 Stres ethanolem

Jedním z možných využití cyanobakterií v průmyslu je fotosyntetická produkce biopaliv. Byla zaznamenána schopnost cyanobakterií produkovat ethanol, avšak naskytl se problém s jeho toxickými účinky na produkční buňky. Ve studii *Ruffing a kol. (2014)*, kde byla pozorována toxicita biopaliv na cyanobakterie bylo zjištěno, že mořský kmen *Synechococcus* sp. 7002 vykazoval zvýšenou toleranci vůči alkoholům s krátkým řetězcem oproti sladkovodním druhům. Složení buněčné membrány u sinic adaptovaných na osmotický stres má tedy pravděpodobně vliv na toleranci alkoholů [127]. Bylo zkoumáno, zda námi testované adaptované kmeny také vykazují větší rezistenci vůči toxickým účinkům 10 % ethanolu.



Obr. 34: Viabilita adaptovaných a neadaptovaných buněk po vystavení kultur 10 % ethanolu

Z výsledků viability buněk po působení ethanolu na cyanobakteriální kultury (Obr. 34), je možné posoudit, že námi zvolená koncentrace ethanolu nepředstavovala velkou toxicitu ani pro neadaptované kmeny. Pokud však máme porovnat mezi kmeny adaptovanými a neadaptovanými, vykazují adaptované kmeny menší úbytek viability. Buněčné změny adaptované na vysokou osmotickou sílu tedy opravdu napomáhají k lepšímu vypořádání s prostředím obsahujícím alkoholy s krátkým řetězcem a adaptované kmeny mohou být vhodné pro fotosyntetickou produkci ethanolu.

Z výsledků akutních stresů působících na adaptované buňky je možné konstatovat, že u všech příkladů byla zaznamenána vyšší rezistence způsobená změnami v morfologii buněk

a adaptované kmeny jsou tak vhodné pro využití v technologickém průmyslu, kde by větší rezistence měla vyřešit problémy s nároky na kultivaci.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo použít metod evolučního inženýrství na vybrané cyanobakteriální kmeny a následně analyzovat adaptované kultury, co se týče jejich rezistence vůči různým stresovým faktorům, morfologie a hlavně akumulace PHA. Pro evoluční experimenty byly zvoleny cyanobakteriální kmeny *Synechocystis sp.* PCC 6803 a *Synechocystis salina* CCALA 192. Před započítáním samotné adaptivní evoluce bylo potřeba optimalizovat podmínky růstu, a to především typ a objem média. Jako vhodnější ze dvou testovaných médií bylo zvoleno M22O, v němž byl zaznamenán lepší růst biomasy. Ve stejném médiu byla poté zaznamenána také větší akumulace PHA.

Po optimalizaci média byl proveden první experiment adaptivní laboratorní evoluce. Jako selekční tlak byl zvolen peroxid vodíku, jelikož se jedná o inhibitor růstu široce užívaný k odstranění cyanobakterií z koupališť a jiných vodních ploch. Tento stresový faktor se ukázal pro účel adaptace velice nevhodný, jelikož do čtyř dnů po jeho aplikaci nastal úhyn obou mikrobiálních kultur. Kontroly experimentu byly dále použity jako ukázkové vzorky pro zaučení na jednotlivé techniky měření.

Pro druhý evoluční experiment byly jako selekční tlak zvoleny Cu^{2+} ionty. Cyanobakteriální kultury byly po dobu 32. dnů vystaveny prostředí s mědí o koncentracích 10 mg/l pro *Synechocystis salina* CCALA 192 a 50 a 200 mg/l pro *Synechocystis sp.* PCC 6803. Po spektrofotometrickém a gravimetrickém stanovení biomasy bylo zjištěno, že kmen *Synechocystis salina* CCALA 192 vykazuje v přítomnosti Cu^{2+} špatný růst, zároveň však u něj byla zaznamenána největší produkce PHA v experimentu, a to 3,33 %. Inhibice růstu byla sledována i u kmene *Synechocystis sp.* PCC 6803, u kterého byl zároveň pozorován pokles produkce PHA oproti pozitivní kontrole. Vzhledem k nízkému nárůstu biomasy byly vzorky po 32. dnech přeočkovány do médií s koncentrací mědi pouze 10 mg/l, ani to však nepomohlo k jejich lepšímu nárůstu a po dalším týdnu došlo k absolutnímu poklesu viability kultur. Cu^{2+} se tedy zdají pro experimenty adaptivní laboratorní evoluce nevhodným stresovým faktorem.

V rámci další série experimentů byl sledován vliv přítomnosti PHA v buňce na rezistenci vůči akutním stresovým faktorům prostředí. Metodou průtokové cytometrie byla sledována viabilita cyanobakteriálních kultur bohatých a chudých na PHB po vystavení tlaku prostředí. Jako akutní stresor byla použita zvýšená teplota a vysoká koncentrace Cu^{2+} . Při vystavení zvýšené teplotě nebyla zaznamenána rezistence u kultur bohatých na PHB, právě naopak, jediný pokles viability s přibývajícím teplotou byl zaznamenán u kultur *Synechocystis sp.* PCC 6803 bohatých na polymer. Akutní stres mědí byl sledován ve dvou různých časech, a to po dobu 1 a 24 hodin. Po dobu 1 hodiny nebyla zaznamenána změna viability u žádné z testovaných kultur. Při vystavení buňkám mědi po 24 hodin již byl zaznamenán markantní úbytek viability u obou kmenů, nebyla však patrná žádná spojitost mezi vysokým obsahem PHB v buňce a zvýšením rezistence. Ani v jednom z případů tedy nebylo prokázáno, že by kultury bohatší na PHB vykazovaly větší toleranci vůči stresovému faktoru než kultury s nízkým obsahem polymeru.

Pro sledování vlivu adaptace na cyanobakteriální buňky byly použity kmeny adaptované na 6% NaCl. Již při vizuálním porovnání byla patrná změna ve zbarvení, naznačující rozdílný podíl

cyanobakteriálních barviv, což se potvrdilo následnou analýzou pomocí UV-VIS spektrofotometrie a extrakce. Adaptované buňky obsahovaly menší podíl všech cyanobakteriálních barviv, kdy největší zaznamenaný rozdíl byl u kmene *Synechocystis sp.* PCC 6803, jehož neadaptované buňky obsahovaly 19,16 µg/ml a adaptované pouze 2,4 µg/ml chlorofylu *a*. Metodou průtokové cytometrie byla sledována také morfologie jednotlivých kultur a bylo zjištěno, že buňky adaptované na vyšší koncentraci soli zmenšily v rámci adaptace svou velikost. Přestože adaptované buňky byly na pohled světlejší a obsahovaly méně barviv, při gravimetrickém stanovení biomasy po 14 dnech kultivace bylo zjištěno, že jí obsahují až trojnásobné množství oproti neadaptovaným buňkám a stejně tak byla zaznamenána akumulace PHA, která u neadaptovaných kmenů o stejném stáří ještě nezapočala. Po 40 dnech kultivace se však tento rozdíl vyrovnal a neadaptované kultury vykazovaly vyšší koncentraci biomasy i akumulovaného PHA. Změny způsobené adaptací tedy kladně působí na nárůst kultury i na produkci PHA v počátku kultivace, po delší době kultivace však vykazují lepší nárůst a akumulaci PHA kultury neadaptované.

V posledním experimentu byla sledována viabilita buněk po působení akutních stresů na kultury adaptované pro prostředí s 6 % NaCl. Jako stresy prostředí byly zvoleny peroxid vodíku, osmotický stres chloridem sodným, mráz a ethanol. Při vystavení kultur peroxidu vodíku byla pozorována zvýšená rezistence u adaptovaných kultur, kdy u neadaptovaných byl úhyn až 90 % a u adaptovaných pouze 52 %. Také při expozici vysokému osmotickému tlaku byla podle předpokladu vyšší odolnost pozorována u adaptovaných kultur. Převážně kmen *Synechocystis sp.* PCC 6803 pro přežití v prostředí s osmotickým stresem adaptaci vyžaduje, jelikož neadaptované kultury nepřežily ani v prostředí s 10 % NaCl. Akumulace osmolytických látek v adaptovaných buňkách, které zároveň sloužily jako kryoprotektanty, přineslo viditelnou výhodu při akutním stresu mrazem, kde byl u obou kultur zaznamenán menší pokles viability v případě adaptovaných buněk. Posledním stresorem aplikovaným na buňky byl ethanol. I u něj byl zaznamenán menší pokles viability způsobený změnami v membráně během adaptace a potvrdil tak, že nové kmeny vzniklé metodami adaptivní laboratorní evoluce vykazují větší rezistenci ve čtyřech z pěti případů. Chlorid sodný se tedy prokázal jako látka vhodná pro experimenty evolučního inženýrství.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TAMAGNINI, P., R. AXELSSON, P. LINDBERG, et al. Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002, **66**(1), 1-20. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.66.1.1-20.2002
- [2] ZAHRA, Z., D. CHOO, H. LEE a A. PARVEEN. Cyanobacteria: Review of Current Potentials and Applications. *Environments*. 2020, **7**(2). ISSN 2076-3298. Dostupné z: doi:10.3390/environments7020013
- [3] STANIER, R a G BAZINE. Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 1977, **31**(1), 225-274. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.001301
- [4] SINGH, S., B. KATE a U. BANERJEE. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, **25**(3), 73-95. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.1080/07388550500248498
- [5] KURMAYER, R., L. DENG a E. ENTFELLNER. Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria *Planktothrix*. *Harmful Algae*. 2016, **54**, 69-86. ISSN 15689883. Dostupné z: doi:10.1016/j.hal.2016.01.004
- [6] *Toxic Cyanobacteria in Water:: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and New York: WHO, 1999. ISBN 0-419-23930-8.
- [7] KUMAR, K., R. MELLA-HERRERA a J. GOLDEN. Cyanobacterial Heterocysts: Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, **2**(4), 000315-000315. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000315
- [8] STANIER (COHEN-BAZIRE), G. Fine structure of cyanobacteria. *Cyanobacteria*. Elsevier, 1988, (167), 157-172. Methods in Enzymology. ISBN 9780121820688. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(88)67017-0
- [9] KNOOP, H., M. GRÜNDEL, Y. ZILLIGES, et al. Flux Balance Analysis of Cyanobacterial Metabolism: The Metabolic Network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Computational Biology*. 2013, **9**(6), 1-16. ISSN 1553-7358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1003081
- [10] SÁNCHEZ-BARACALDO, P. a T. CARDONA. On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytologist*. 2020, **225**(4), 1440-1446. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.16249

- [11] VERMAAS, W. FJ. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*. Arizona, USA, 2001, , 1-7. Dostupné z: doi:10.1038/npg.els.0001670
- [12] ZHANG, S. a D. BRYANT. The Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria. *Science*. 2011, **334**(6062), 1551-1553. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1210858
- [13] STEINHAUSER, D., A. FERNIE a W. ARAÚJO. Unusual cyanobacterial TCA cycles: not broken just different. *Trends in Plant Science*. 2012, **17**(9), 503-509. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2012.05.005
- [14] LUAN, G., S. ZHANG, M. WANG a X. LU. Progress and perspective on cyanobacterial glycogen metabolism engineering. *Biotechnology Advances*. 2019, **37**(5), 771-786. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2019.04.005
- [15] DE PORCELLINIS, A., N.U. FRIGAARD a Y. SAKURAGI. Determination of the Glycogen Content in Cyanobacteria. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, (125), 1-6. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/56068
- [16] GUPTA, V., S. RATHA, A. SOOD, et al. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. *Algal Research*. 2013, **2**(2), 79-97. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2013.01.006
- [17] GADEMANN, K. a C. PORTMANN. Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry*. 2008, **12**(4), 326-341. ISSN 13852728. Dostupné z: doi:10.2174/138527208783743750
- [18] WIEGAND, C. a S. PFLUGMACHER. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, **203**(3), 201-218. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2004.11.002
- [19] BURJA, A., B. BANAIGS, E. ABOU-MANSOUR, J. GRANT BURGESS a P. WRIGHT. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron*. 2001, **57**(46), 9347-9377. ISSN 00404020. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-4020(01)00931-0
- [20] MATALONI, G. a J. KOMÁREK. Gloeocapsopsis aurea, a new subaerophytic cyanobacterium from maritime Antarctica. *Polar Biology*. 2004, **27**(10), 623-628. ISSN 0722-4060. Dostupné z: doi:10.1007/s00300-004-0620-6

- [21] WHITTON, B.A. a M POTTS. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* [online]. 1. Netherlands: Springer Netherlands, 2002 [cit. 2021-04-15]. ISBN 978-0-306-46855-1. Dostupné z: <https://www.springer.com/gp/book/9780792347354>
- [22] USHER, K. M. The ecology and phylogeny of cyanobacterial symbionts in sponges. *Marine Ecology*. 2008, **29**(2), 178-192. ISSN 01739565. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1439-0485.2008.00245.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2008.00245.x)
- [23] BROOKES, J. D. Variations in the buoyancy response of *Microcystis aeruginosa* to nitrogen, phosphorus and light. *Journal of Plankton Research*. 2001, **23**(12), 1399-1411. ISSN 14643774. Dostupné z: [doi:10.1093/plankt/23.12.1399](https://doi.org/10.1093/plankt/23.12.1399)
- [24] JOHNSON, Z. I. Niche Partitioning Among *Prochlorococcus* Ecotypes Along Ocean-Scale Environmental Gradients. *Science*. 2006, **311**(5768), 1737-1740. ISSN 0036-8075. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1118052](https://doi.org/10.1126/science.1118052)
- [25] HOICZYK, E. Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Archives of Microbiology*. 2000, **174**(1-2), 11-17. ISSN 0302-8933. Dostupné z: [doi:10.1007/s002030000187](https://doi.org/10.1007/s002030000187)
- [26] JONES, A., E. MONROE, S. PODELL, et al. Genomic insights into the physiology and ecology of the marine filamentous cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, **108**(21), 8815-8820. ISSN 0027-8424. Dostupné z: [doi:10.1073/pnas.1101137108](https://doi.org/10.1073/pnas.1101137108)
- [27] ENGINE, N., E. ROTTACKER, J. KAŠTOVSKÝ, et al. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012, **62**(5), 1171-1178. ISSN 1466-5026. Dostupné z: [doi:10.1099/ijs.0.033761-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.033761-0)
- [28] IVANIKOVA, N., L. POPELS, R. MCKAY a G. BULLERJAHN. Lake Superior Supports Novel Clusters of Cyanobacterial Picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, **73**(12), 4055-4065. ISSN 0099-2240. Dostupné z: [doi:10.1128/AEM.00214-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00214-07)
- [29] OKELLO, W., C. PORTMANN, M. ERHARD, et al. Occurrence of microcystin-producing cyanobacteria in Ugandan freshwater habitats. *Environmental Toxicology*. 2010, **25**(4), 367-380. ISSN 15204081. Dostupné z: [doi:10.1002/tox.20522](https://doi.org/10.1002/tox.20522)
- [30] KOMÁREK, J. Coccoid and colonial cyanobacteria. *Freshwater Algae of North America*. Elsevier, 2003, 59-116. ISBN 9780127415505. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-012741550-5/50004-0](https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50004-0)

- [31] BÜDEL, B., T. DARIENKO, K. DEUTSCHEWITZ et al. Southern African Biological Soil Crusts are Ubiquitous and Highly Diverse in Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency. *Microbial Ecology*. 2009, **57**(2), 229-247. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-008-9449-9
- [32] BILLI, D., M. BAQUÉ, C. VERSEUX, et al. Desert Cyanobacteria: Potential for Space and Earth Applications. *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 133-146. ISBN 978-3-319-48325-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-48327-6_6
- [33] KORELUSOVÁ, J., J. KASŤOVSKÝ a J. KOMÁREK. HETEROGENEITY OF THE CYANOBACTERIAL GENUS SYNECHOCYSTIS AND DESCRIPTION OF A NEW GENUS, GEMINOCYSTIS1. *Journal of Phycology*. 2009, **45**(4), 928-937. ISSN 00223646. Dostupné z: doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00701.x
- [34] KANEKO, T., S. SATO, H. KOTANI, et al. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Research*. 1996, **3**(3), 109-136. ISSN 1340-2838. Dostupné z: doi:10.1093/dnares/3.3.109
- [35] IKEUCHI, M. a S. TABATA. Synechocystis sp. PCC 6803 — a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. 2001, **70**(1), 73-83. ISSN 01668595. Dostupné z: doi:10.1023/A:1013887908680
- [36] Synechocystis. In: *Alchetron* [online]. Kalyan, Maharashtra, India, 2014 [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://alchetron.com/Synechocystis#synechocystis-4ccc7e63-5763-491e-8ecb-d1a29ff3a43-resize-750.jpeg>
- [37] GONCALVES, A., J. PIRES a M. SIMOES. Biotechnological potential of Synechocystis salina co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresource Technology*. 2016, **200**, 279-286. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2015.10.023
- [38] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*. 2010, **55**(1), 17-22. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0003-z
- [39] POIRIER, Y. Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Plant Peroxisomes. *Plant Peroxisomes*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002, , 465-496. ISBN 978-90-481-6007-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-015-9858-3_15

- [40] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [41] EGGINK, G., P. WAARD a G. HUIJBERTS. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, **41**(13), 14-21. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/m95-163
- [42] LU, J., R. TAPPEL a C. NOMURA. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*. 2009, **49**(3), 226-248. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720903048243
- [43] LI, Z., J. YANG a X. LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*. 2016, **8**(4), 265-265. ISSN 1884-4049. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [44] VAN DE VELDE, K a P KIEKENS. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*. 2002, **21**(4), 433-442. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9418(01)00107-6
- [45] ŠPITALSKÝ, Z., I. LACÍK, E. LATHOVÁ, et al. Controlled degradation of polyhydroxybutyrate via alcoholysis with ethylene glycol or glycerol. *Polymer Degradation and Stability*. 2006, **91**(4), 856-861. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.06.019
- [46] SEDLACEK, P., E. SLANINOVA, V. ENEV, et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, **103**(4), 1905-1917. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-09584-z
- [47] WINNACKER, M. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2019, **121**(11). ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201900101
- [48] FERRE-GUELLE, A. a J. WINTERBURN. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates with Controlled Composition and Microstructure. *Biomacromolecules*. 2018, **19**(3), 996-1005. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.7b01788
- [49] ZAPLETAL, M. a J. TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické Listy* [online]. Czech Society of Chemical Engineering, 2016, **110**(12), 860-867 [cit. 2021-05-08]. ISSN 00092770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120/120>

- [50] TAN, G. Y., C. Y. CHEN, L. LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. 2014, **6**(3), 706-754. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6030706
- [51] TARONCHER-OLDENBURG, G., K. NISHINA a G. STEPHANOPOULOS. Identification and Analysis of the Polyhydroxyalkanoate-Specific β -Ketothiolase and Acetoacetyl Coenzyme A Reductase Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, **66**(10), 4440-4448. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.10.4440-4448.2000
- [52] DROSG, B. Photo-autotrophic Production of Poly(hydroxyalkanoates) in Cyanobacteria. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2015, **29**(2), 145-156. ISSN 03529568. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2014.2254
- [53] SINGH, A., L. SHARMA, N. MALLICK a J. MALA. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*. 2017, **29**(3), 1213-1232. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-016-1006-1
- [54] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, **102**(6), 1437-1449. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [55] JENDROSSEK, D. a R. HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*. 2002, **56**(1), 403-432. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- [56] JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, **74**(6), 1186-1196. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-007-0860-9
- [57] ONG, S, J. CHEE a K. SUDESH. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2017, **10**(2), 21-225. ISSN 19971389. Dostupné z: doi:10.17516/1997-1389-0024
- [58] MADISON, L. a G. HUISMAN. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999, **63**(1), 21-53. ISSN 1098-5557. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999
- [59] DOS SANTOS, A., L. OLIVEIRA DALLA VALENTINA, et al. From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*. 2017, **13**(26), 269-298. ISSN 17949165. Dostupné z: doi:10.17230/ingciencia.13.26.10

- [60] CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009, **38**(8), 2434-2446. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b812677c
- [61] TING, C., G. ROCAP, J. KING a S. CHISHOLM. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in Microbiology*. 2002, **10**(3), 134-142. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/S0966-842X(02)02319-3
- [62] PANDA, B. a N. MALLICK. Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, **44**(2), 194-198. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x
- [63] NISHIOKA, M., K. NAKAI, M. MIYAKE, Y. ASADA a M. TAYA. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. *Biotechnology Letters*. 2001, **23**(14), 1095-1099. ISSN 01415492. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010551614648
- [64] WU, G.F, Q.Y WU a Z.Y SHEN. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresource Technology*. 2001, **76**(2), 85-90. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(00)00099-7
- [65] KOVALCIK, A., K. MEIXNER, M. MIHALIC, et al. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, **102**, 497-504. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.054
- [66] SUDESH, K., K. TAGUCHI a Y. DOI. Effect of increased PHA synthase activity on polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2002, **30**(2), 97-104. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(02)00010-7
- [67] TROSCHL, C., K. MEIXNER a B. DROSG. Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering*. 2017, **4**(4), 4. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering4020026
- [68] KHETKORN, W., A. INCHAROENSAKDI, P. LINDBLAD a S. JANTARO. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresource Technology*. 2016, **214**, 761-768. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.05.014

- [69] WANG, S., W. CHEN, H. XIANG, et al. Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). *Polymers*. 2016, **8**(8), 16-19. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym8080273
- [70] FABRA, M., A. LÓPEZ-RUBIO a J. LAGARON. On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts. *Food Hydrocolloids*. 2014, **39**, 77-84. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2013.12.023
- [71] CHEA, V., H. ANGELLIER-COUSSY, S. PEYRON, et al. Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) films for food packaging: Physical-chemical and structural stability under food contact conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016, **133**(2), 1. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41850
- [72] DÍEZ-PASCUAL, A. a A. DÍEZ-VICENTE. ZnO-Reinforced Poly(3-hydroxybutyrate-co -3-hydroxyvalerate) Bionanocomposites with Antimicrobial Function for Food Packaging. *Applied materials and interfaces*. 2014, **6**(12), 9822-9834. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am502261e
- [73] WU, J., K. XUE, H. LI, et al. Improvement of PHBV Scaffolds with Bioglass for Cartilage Tissue Engineering. *PLOS ONE*. 2013, **8**(8), 1-9. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0071563
- [74] PORTER, M., S. LEE, N. TANADCHANGSAENG, et al. Porous Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Fabricated by a Novel Method Via Centrifugation. *Mechanics of Biological Systems and Materials, Volume 5*. New York, NY: Springer New York, 2013, **5**, 63-71. Conference Proceedings of the Society for Experimental Mechanics Series. ISBN 978-1-4614-4426-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-4427-5_10
- [75] HUANG, W., X. SHI, L. REN, et al. PHBV microspheres – PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010, **31**(15), 4278-4285. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.059
- [76] CHEN, W. a Y. TONG. PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon–dendrite polarization. *Acta Biomaterialia*. 2012, **8**(2), 540-548. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2011.09.026
- [77] VALAPPIL, S., S. MISRA, A. BOCCACCINI a I. ROY. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert Review of Medical Devices*. 2014, **3**(6), 853-868. ISSN 1743-4440. Dostupné z: doi:10.1586/17434440.3.6.853

- [78] BAPTIS, J. a J. ZIEGLER. *METHOD OF MAKENG ABSORBABLE SURGICAL SUTURES FROM POLY BETA HYDROXY ACIDS*. 1965. US. 3225766. Uděleno 1962-03-26. Zapsáno 1965-12-28.
- [79] SHISHATSKAYA, E., E. NIKOLAEVA, O. VINOGRADOVA a T. VOLOVA. Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016, **27**(11), 1-16. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-016-5776-4
- [80] POLLET, E. a L. AVÉROUS. Production, Chemistry and Properties of Polyhydroxyalkanoates. *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*. Chichester, UK, 2011, , 65-86. ISBN 9781119994312. Dostupné z: doi:10.1002/9781119994312.ch4
- [81] MA, Y. M., D. X. WEI, . YAO, et al. Synthesis, Characterization and Application of Thermoresponsive Polyhydroxyalkanoate- graft -Poly(N -isopropylacrylamide). *Biomacromolecules*. 2016, **17**(8), 2680-2690. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.6b00724
- [82] YAO, Y. C., X. Y. ZHAN, J. ZHANG, et al. A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*. 2008, **29**(36), 4823-4830. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.008
- [83] DRAGOSITS, M. a D. MATTANOVICH. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 2013, **12**(1), 1-17. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-12-64
- [84] REN, Q., K. RUTH, L. THÖNY-MEYER a M. ZINN. Enatiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, **87**(1), 41-52. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-010-2530-6
- [85] CAKAR, Z, U SEKER, C TAMERLER, M SONDEREGGER a U SAUER. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant. *FEMS Yeast Research*. 2005, **5**(6-7), 569-578. ISSN 15671356. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsyr.2004.10.010
- [86] PHILLIPS, T. Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology. *Nature Education* [online]. 2008, **1**(213), 1 [cit. 2021-07-10]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetically-modified-organisms-gmos-transgenic-crops-and-732/>
- [87] PORTNOY, V., D. BEZDAN a K. ZENGLER. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in*

- Biotechnology*. 2011, **22**(4), 590-594. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.03.007
- [88] SANDBERG, T., M. SALAZAR, L. WENG, et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*. 2019, **56**, 1-16. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2019.08.004
- [89] PACKER, M. a D. LIU. Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics*. 2015, **16**(7), 379-394. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3927
- [90] BENNETT, A. a B. HUGHES. Microbial experimental evolution. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2009, **297**(1), 17-25. ISSN 0363-6119. Dostupné z: doi:10.1152/ajpregu.90562.2008
- [91] LENSKI, R., J. MONGOLD, P. SNIEGOWSKI, et al. Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: What makes one genotype a better competitor than another. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1997, **73**(1), 35-47. ISSN 00036072. Dostupné z: doi:10.1023/A:1000675521611
- [92] BARRICK, J. a R. LENSKI. Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2013, **14**(12), 827-839. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3564
- [93] LARSSON, G., S.-O. ENFORS a H. PHAM. The pH-auxostat as a tool for studying microbial dynamics in continuous fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 1990, **36**(3), 224-232. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.260360303
- [94] WRIGHT, J., E. BELLISIMI, E. DE HULSTER, et al. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2011, **11**(3), 299-306. ISSN 15671356. Dostupné z: doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00719.x
- [95] NAM, H., T. CONRAD a N. LEWIS. The role of cellular objectives and selective pressures in metabolic pathway evolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, **22**(4), 595-600. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.03.006
- [96] RACHEDI, R., M. FOGLINO a A. LATIFI. Stress Signaling in Cyanobacteria: A Mechanistic Overview. *Life*. 2020, **10**(12), 1-24. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life10120312

- [97] WILTBANK, L. a D. KEHOE. Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors. *Nature Reviews Microbiology*. 2019, **17**(1), 37-50. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-018-0110-4
- [98] SANFILIPPO, J., L. GARCZAREK, F. PARTENSKY a D. KEHOE. Chromatic Acclimation in Cyanobacteria: A Diverse and Widespread Process for Optimizing Photosynthesis. *Annual Review of Microbiology*. 2019, **73**(1), 407-433. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-020518-115738
- [99] SCHUERGERS, N., C. MULLINEAUX a A. WILDE. Cyanobacteria in motion. *Current Opinion in Plant Biology*. 2017, **37**, 109-115. ISSN 13695266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2017.03.018
- [100] GLATZ, A., I. VASS, D. LOS a L. VÍGH. The Synechocystis model of stress: from molecular chaperones to membranes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1999, **37**(1), 1-12. ISSN 09819428. Dostupné z: doi:10.1016/S0981-9428(99)80061-8
- [101] EHLING-SCHULZ, M., S. SCHULZ, R. WAIT, et al. The UV-B stimulon of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* comprises early shock proteins and late acclimation proteins. *Molecular Microbiology*. 2002, **46**(3), 827-843. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03209.x
- [102] SEN, S. Cyanobacterial membrane biology under environmental stresses with particular reference to photosynthesis and photomorphogenesis. *Advances in Cyanobacterial Biology*. Elsevier, 2020, 73-84. ISBN 9780128193112. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819311-2.00006-1
- [103] LATIFI, A., M. RUIZ a C. C. ZHANG. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009, **33**(2), 258-278. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x
- [104] REED, R. a W. STEWART. Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biology*. 1985, **88**(1), 1-9. ISSN 0025-3162. Dostupné z: doi:10.1007/BF00393037
- [105] WUTIPRADITKUL, N., R. WADITEE, A. INCHAROENSAKDI et al. Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Contains NapA-Type Na⁺/H⁺ Antiporters with Novel Ion Specificity That Are Involved in Salt Tolerance at Alkaline pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, **71**(8), 4176-4184. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.8.4176-4184.2005
- [106] CURATTI, L., E. FOLCO, P. DESPLATS, et al. Sucrose-Phosphate Synthase from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: Identification of the *spsA* Gene and Characterization of the Enzyme Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*.

- 1998, **180**(24), 6776-6779. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.180.24.6776-6779.1998
- [107] CHRISMAS, N., A. ANESIO a P. SÁNCHEZ-BARACALDO. Multiple adaptations to polar and alpine environments within cyanobacteria: a phylogenomic and Bayesian approach. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **6**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.01070
- [108] RAJARAM, H. a S. KUMAR APTE. Heat-shock response and its contribution to thermotolerance of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *Archives of Microbiology*. 2003, **179**(6), 423-429. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-003-0549-0
- [109] PHADTARE, S., J. ALSINA a M. INOUE. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, **2**(2), 175-180. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(99)80031-9
- [110] VASI, F., M. TRAVISANO a R. LENSKI. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. II. Changes in Life-History Traits During Adaptation to a Seasonal Environment. *The American Naturalist*. 1994, **144**(3), 432-456. ISSN 0003-0147. Dostupné z: doi:10.1086/285685
- [111] HONG, K.-K., W. VONGSANGNAK, G. VEMURI a J. NIELSEN. Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, **108**(29), 12179-12184. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1103219108
- [112] SANDBERG, T., M. PEDERSEN, R. LACROIX, et al. Evolution of *Escherichia coli* to 42 °C and Subsequent Genetic Engineering Reveals Adaptive Mechanisms and Novel Mutations. *Molecular Biology and Evolution*. 2014, **31**(10), 2647-2662. ISSN 1537-1719. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msu209
- [113] JI, X. J., H. HUANG a P. K. OUYANG. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*. 2011, **29**(3), 351-364. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.007
- [114] GUIMARÃES, P., J. FRANÇOIS, J. PARROU, et al. Adaptive Evolution of a Lactose-Consuming *Saccharomyces cerevisiae* Recombinant. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, **74**(6), 1748-1756. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00186-08

- [115] KAO, K. a G. SHERLOCK. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genetics*. 2008, **40**(12), 1499-1504. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng.280
- [116] PASSANHA, P., S. ESTEVES, G. KEDIA, et al. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource Technology*. 2013, **147**, 345-352. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2013.08.050
- [117] MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*. 2018, **120**(1), 1-11. ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
- [118] CHIOCCIOLI, M., B. HANKAMER, I. ROSS a R. DUHALT. Flow Cytometry Pulse Width Data Enables Rapid and Sensitive Estimation of Biomass Dry Weight in the Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. *PLoS ONE*. 2014, **9**(5). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0097269
- [119] PIEL, T., G. SANDRINI, E. WHITE, et al. Suppressing Cyanobacteria with Hydrogen Peroxide Is More Effective at High Light Intensities. *Toxins*. 2020, **12**(1). ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12010018
- [120] GARCÍA-VILLADA, L., M. RICO, M. ALTAMIRANO, et al. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algicide. *Water Research*. 2004, **38**(8), 2207-2213. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2004.01.036
- [121] SHAVYRINA, O., L. GAPOCHKA a A. AZOVSKII. Development of Tolerance for Copper in Cyanobacteria Repeatedly Exposed to Its Toxic Effect. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 2001, **28**(2), 183-187. ISSN 10623590. Dostupné z: doi:10.1023/A:1009423201364
- [122] SHENG, J., H. KIM, J. BADALAMENTI, et al. Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis* sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor. *Bioresource Technology*. 2011, **102**(24), 11218-11225. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.09.083
- [123] SCHUBERT, H., S. FULDA a M. HAGEMANN. Effects of Adaptation to Different Salt Concentrations on Photosynthesis and Pigmentation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Plant Physiology*. 1993, **142**(3), 291-295. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1016/S0176-1617(11)80425-6
- [124] SHRIVASTAV, A., S. MISHRA a S. MISHRA. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *International Journal of Biological*

Macromolecules. 2010, **46**(2), 255-260. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001

- [125] GOVRIN, R., T. OBSTBAUM a U. SIVAN. Common Source of Cryoprotection and Osmoprotection by Osmolytes. *Journal of the American Chemical Society*. 2019, **141**(34), 13311-13314. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.9b06727
- [126] CLELAND, D., P. KRADER, C. MCCREE, et al. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, **58**(1), 31-38. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2004.02.015
- [127] RUFFING, A. a C. TRAHAN. Biofuel toxicity and mechanisms of biofuel tolerance in three model cyanobacteria. *Algal Research*. 2014, **5**, 121-132. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2014.07.006

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PHA	polyhydroxyalkanoáty
ALE	adaptivní laboratorní evoluce
např.	například
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
PQ	plastochinon
NADP ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
ATP	adenosintrifosfát
SDH	sukcinátdehydrogenáza
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
2-OGDH	2-oxoglutarátdehydrogenáza
2OG	2-oxoglutarátu
SSADH	sukcinát-semialdehyddehydrogenázu
GTP	guanosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
PCC	Pasteur Culture Collection
CCALA	Culture Collection of Autotrophic Organismus
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým bočním řetězcem
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým bočním řetězcem
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým bočním řetězcem
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PHO	poly(3-hydroxyoktanoát)
PHN	poly(3-hydroxynonanoát)
HHx	3-hydroxyhexanoát
HH	hydroxyheptanoát
HD	hydroxydekanoát
UV	ultrafialová

PP	polypropylen
HA	hydroxyapatit
PLGA	poly(mléčna-co-glykolová kyselina)
FID	plamenový ionizační detektor
ISTD	inertní standard
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná